K X D

STATENS VÄXTSKYDDSANSTALT
MEDDELANDE N:r 37



IMP. INST. ENT.
LIBRARY
27 NOV 1945
SERIAL Eu.103A
SEPARATE

UNDERSÖKNINGAR RÖRANDE KLÖVERRÖTAN

II. STUDIER AV UTVECKLINGSHISTORIA OCH VARIATION HOS SCLEROTINIA TRIFOLIORUM

AV
K. BJÖRLING

DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG



STOCKHOLM 1942

STATENS VÄXTSKYDDSANSTALT
MEDDELANDE N:r 37



UNDERSÖKNINGAR RÖRANDE KLÖVERRÖTAN

II. STUDIER AV UTVECKLINGSHISTORIA OCH VARIATION HOS SCLEROTINIA TRIFOLIORUM

AV
K. BJÖRLING

DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG



STOCKHOLM 1942



EMIL KIHLSTRÖMS TRYCKERI A.-B.
STOCKHOLM 1942
14069

Innehåll.

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/meddelanden-statens-vaxtskyddsanstalt_1942_5_37

Inledning.

Klöverrötan är utan gensägelse den allvarligaste sjukdomen på vissa odlade leguminoser framför allt klöver och lucern. Sjukdomen orsakas av svampen *Sclerotinia trifoliorum* Erikss., vilken under höstmånaderna medelst sporer angriper bladen på ovannämnda växter. Angreppen äro till en början föga framträdande, i det att endast mycket små bruna fläckar uppstå. Efter hand inträder en m. e. m. kraftig mycelväxt, vilken särskilt under milda vintrar får en förhärjande verkan, då icke blott den från början infekterade plantan utan även omkringstående angripas och så småningom dödas. Under denna sjukdomsprocess bildar svampen på eller i värdväxten motståndskraftiga till färgen svarta i regel ärt- till bönstora vilkroppar, sklerotier. Dessa kvarligga i jorden och gro i allmänhet först följande höst, då små, kanelbruna, med skaft försedda, skålformiga fruktkroppar, apothecier, utvecklas. I dessa bildas infektionsdugliga sporer, vilka i stora mängder utslungas i luften. En mera detaljerad beskrivning av sjukdomsförloppet återfinnes hos NILSSON-LEISSNER och SYLVÉN (1929).

Mot sjukdomen m. e. m. resistenta klöverstammar (SYLVÉN 1936) ävensom enskilda resistenta plantor ur dessa stammar (RUDORF 1937) ha iakttagits. Den av klöverrötan orsakade ekonomiska skadegörelsen är avsevärd såväl i utlandet (KLEMM 1938) som i vårt land (LINDFORS och HOLMBERG 1941).

Under de senaste åren har resistensförädling av klöver och lucern mot denna sjukdom bedrivits i allt mera ökad omfattning i vårt land (NILSSON-EHLE 1935, SYLVÉN 1936, NILSSON-LEISSNER and NILSSON 1940). I samband härmed har också förekomsten av olika patogena (fysiologiska) raser hos svampen påvisats (BJÖRLING 1939). Två för resistensförädlingen viktiga frågor äro f. n. aktuella. Den första gäller om dessa patogena raser äro konstanta eller ej, den andra, vari den såväl i praktiken som i försök iakttagna värdväxtresistensen består. För att kunna besvara dessa frågor är det nödvändigt att i detalj känna såväl parasitens utvecklingshistoria som dess variationsmöjligheter. Trots att flera undersökningar angående olika delar av biologien hos *S. trifoliorum* såväl tidigare (REHM 1872, COLEMAN 1907, GILBERT and BENNET 1917 m. fl.) som helt nyligen (PAPE 1937, POHJA-

KALLIO 1940, HENSON and VALLEAU 1940, NICOLAISEN, LEITZKE und WITZIG 1940) publicerats, äro dock väsentliga avsnitt, framför allt svampens cytologi, hittills ofullständigt eller icke alls klarlagda.

Avsikten med de föreliggande undersökningarna, som utförts under åren 1938—1941 vid Statens Växtskyddsanstalts filial i Alnarp med några försök förlagda till Sveriges Utsädesförening, Svalöv, har varit att söka belysa vissa av dessa luckor i vår kännedom om svampens utvecklingshistoria och variationsmöjligheter, varigenom säkrare utgångspunkter för ett angrepp på det egentliga resistensproblemet skulle erhållas. Vid framläggandet av försöksresultaten har i möjligaste mån utvecklingshistorien (Kap. II—V) sökts hållas skild från variationen (Kap. VI—VIII). En del av den modifikativa variationen, särskilt de av temperatur och ljusinflytanden orsakade fenotypiska förändringarna i vissa organ ha dock ansetts i så hög grad höra samman med den allmänna utvecklingshistorien, att de behandlats jämsides med denna. Under arbetets förlopp har kontakt uppnåtts med flera av de moderna, allmänna mykologiska problemen, av vilka några komma att diskuteras, ehuru deras fulla berättigande i en växtpatologisk avhandling möjligen kan ifrågasättas.

Vid detta tillfälle är det mig en angenäm plikt att framföra ett vördsamt tack till mina akademiska lärare i botanik och ärftlighetslära professorerna vid Lunds Universitet H. KYLIN och N. HERIBERT-NILSSON, professor emer. H. NILSSON-EHLE samt docent A. HÅKANSSON. Vidare står jag i tacksamhetsskuld till min förste lärare i mykologi, docent B. T. PALM samt till chefen för Birkbeck College, University of London, professor Dame HELEN GWYNNE-VAUGHAN, under vars erfarna ledning jag blivit förtrogen med för askomyceter speciellt lämpad cytologisk teknik.

För givande diskussioner och värdefull kritik vill jag särskilt framföra mitt varma tack till föreståndaren för Statens Växtskyddsanstalts filial i Alnarp, fil. kand. J. MÜHLOW samt till fil. dr. G. NILSSON-LEISSNER, Svalöv.

I. Material och metodik.

Svampmaterialet insamlades från klövervallar huvudsakligen i form av sklerotier. Efter ytsterilisering uttogs med en steril nål från sklerotiernas inre ett mindre vävnadsparti, vilket placerades på näringsagar, där mycel och nya sklerotier bildades. En mindre del av materialet insamlades i form av apothecier, vilka under sterila förhållanden fingo kasta askosporer på ett täckglas, varifrån dessa i stort antal utsåddes på näringsagar. På så sätt erhölls av varje sklerotium respektive apothecium en renkultur, vil-

ken vegetativt förökades under beteckningen stam. Dessa kulturer voro i så måtto rena, att inga artfrämmande svampar eller bakterier funnos närvarande. Närmare analyser i form av ensporuttagningar och jämförande odlingar av respektive ensporkulturer visade emellertid, att utgångsmaterialet i en del fall var heterogent. Denna heterogenitet bestod i, att hyferna i vissa stammar innehöllo genotypiskt olika cellkärnor. I dessa fall skedde alltså i laboratoriet genom sporisoleringarna en vidare uppdelning av stammen i mindre enheter, biotyper. Flertalet stammar visade sig dock vid analys vara homogena, d. v. s. innehöllo cellkärnor av samma genotypiska konstitution.

Övervägande delen av materialet insamlades av mig själv under åren 1938—1941 i Skåne. På flera platser togos prov från olika punkter inom begränsade områden, t. ex. ett och samma klöverfält. Avstånden mellan proven varierade i så fall från några centimeter till ett par hundratal meter. Ett sklerotieprov från Ångermanland erhölls av fil. dr. E. ÅKERBERG, Undrom, ett från Ultuna jämte två från Luleå av fil. lic. H. EKSTRAND, Stockholm. Från Danmark mottogs som utbyte av försöksledare FRANDSEN, Ötoftegaard, Taastrup, fem olika stammar samt från U. S. A. likaledes som utbyte fem sklerotiekulturer av L. HENSON. Materialets härstamning och beteckning framgår av tabell 1. *Sclerotinia*biotyperna angivas i fortsättningen med moderstammens beteckning jämte ett streck och ett nummer, t. ex. Sval 6 (stam) och Sval 6—1 (biotyp ur denna stam).

I en del av de i tabell 1 ingående fallen, då utgångsmaterialet utgjordes av friliggande sklerotier eller apothecier, kunde värdväxtens art endast med en viss grad av sannolikhet bestämmas med ledning av den omgivande vegetationen. I andra fall isolerades sklerotierna från döda plantdelar, varvid värdväxtens art i regel kunde identifieras.

Enaskosporkulturer av svampen, vilka i fortsättningen för korthetens skull benämnas ensporkulturer, framställdes huvudsakligen enligt den av flera amerikanska mykologer använda, förenklade metoden (SCHREINER 1931, HANSEN and SMITH 1932, DIMOCK 1937 m. fl.). Efter steril sporspridning på en näringsagarplatta — lämpligaste täthet för *S. trifoliorum* visade sig vara 300—600 sporer på en platta med 10 cm. diameter — uttogos sporerna för hand med en steril nål vid låg förstoring. Före uttagningen, vilken skedde 12—24 timmar efter spridningen, granskades varje spor vid större förstoring. Groddslangarna voro då en till ett par gånger så långa som sporen, varigenom full säkerhet erhölls, att endast en individ isolerades varje gång. I vissa fall uttogos sporerna direkt ur askus med mikromanipulator (typ: ZEISS, MIPU).

Ensporkulturerna voro genetiskt enhetliga och med vissa undantag självfertila. De förökades i kultur såväl vegetativt genom mycel eller sklerotier, som sexuellt genom apothecier. I enlighet med den av JOHANNSEN 1904

Tabell 1. *Materialets härstamning.*
Herstammung des Materials.

Lokal Gegend	Antal renodlade stammar Anzahl reingezüchteter Stämme	Beteckning Bezeichnung	Värdväxt Wirtspflanze
Sverige:			
Skåne:			
Hammenhög	2	H-g 2, 4	*Trifolium pratense*
Högestad	1	Hög 1	*Medicago lupulina*
Wemmenhög	2	Wn 2, 3	*Trifolium pratense*
Fredshög	1	F-hög 1	*Medicago sativa*
Limhamn	2	El 1, 2	*Trifolium repens*
Dalbytrakten	10	X 1—X 13	*Trifolium pratense, hybr.*
Åkarp	2	Åk 1, 2	*Trifolium pratense*
Hörbytrakten	10	Y 1—Y 16	» »
Teckomatorp	1	Teck 4	» »
Svalöv	45	Sval 6—Sval 78	*Trif. prat., repens, hybr.*
Weibullsholm	3	W 6, 8, 9	*Trifolium pratense, hybr.*
Svedberg	5	Sved 4—Sved 8	*Trifolium pratense*
Mell. Sverige:			
Ultuna	1	Ul 7	» »
Norra Sverige:			
Ångermanland	1	Ång 1	» »
Luleå	2	Lu 5, 13	» »
Danmark:			
Själland:			
Ötoftegaard	1	KD 1	» »
»	1	KD 2	» *hybridum*
»	1	KD 3	*Lotus corniculatus*
Asmindrup	1	KD 4	*Trifolium pratense*
Jylland:			
Randers	1	KD 5	» »
U. S. A.:			
Kentucky	1	8 Sc	*Melilotus alba*
»	1	10 A	*Medicago sativa*
»	1	17 C	*Trifolium incarnatum*
»	1	30 R	» *pratense*
New York	1	40 R	» »

(1926) uppställda definitionen på biotyp, tillämpas denna term i det följande på ensporkulturer med genotypiskt lika cellkärnor.

Terminologien betr. asko- och basidiomyceternas sexualitetsförhållanden är f. n. icke enhetlig. De av BLAKESLEE införda termerna homothalli och heterothalli användas fortfarande konsekvent av en del mykologer (DODGE 1927, 1928, BULLER 1941), varvid dock den förstnämnda termen tillämpas såväl på homokaryotiskt självfertila arter (ex. *Pyronema confluens*, CLAUSSEN 1912, *Coprinus sterquilinus*, MOUNCE 1921) som på arter, vilka endast i heterokaryotiskt tillstånd äro självfertila (*Neurospora tetrasperma*, DODGE 1927, *Pleurage anserina*, DOWDING 1931, *Gelasinospora tetrasperma*, DOWDING 1933). — KNIEP (1928, 1929) förkastade uttrycken homo- och heterothalli och ersatte dem med haplomonöci (isohaplontisk resp. miktohaplontisk) och haplodiöci. Jämte ovannämnda båda termgrupper har under det sista årtiondet beträffande askomyceterna termen självsterilitet tillämpats på vissa heterothalliska arter (ex. *Pleurage anserina*, AMES 1932, 1934, *Sclerotinia Gladioli*, DRAYTON 1932, 1934, jfr. även GWYNNE-VAUGHAN and BARNES 1937 samt WINGE 1937). Vidare har GREIS (1941) med tillämpande av KNIEPS terminologi och HARTMANNS AG-sexualitetsteori (HARTMANN 1929, 1939) genom en rad viktiga undersökningar av den sexuellt labila arten *Sordaria fimicola* belyst förhållandet mellan haplomonöci och haplodiöci.

Det föreliggande stam- och biotypmaterialet av *S. trifoliorum* visade sig, bortsett från några fall av inducerad sterilitet (Kap. II, 3) i sexuellt avseende vara mycket stabilt. Fortplantningsförhållandena ligga hos denna art betydligt enklare till än i ovannämnda fall. Enligt KNIEPS terminologi kan *S. trifoliorum* betecknas som i regel isohaplontiskt monoic. På grund av det föreliggande materialets beskaffenhet har jag dock funnit det mera praktiskt att i fortsättningen använda uttrycken homo- eller heterokaryotiskt självfertila enheter (biotyper eller stammar).

Det för odlingarna huvudsakligen använda substratet var syntetisk näringsagar av följande sammansättning per liter substrat:

glykos	25.00	gram
kaliumnitrat	5.00	»
monokaliumfosfat	2.50	»
magnesiumsulfat	1.25	»
agar	15.00	»

I allmänhet användes vattenledningsvatten; i vissa försöksserier ersattes detta med destillerat vatten tillsatt med fem droppar 10-procentig järnkloridlösning per liter. För erhållande av större sklerotiemängder utfördes en del odlingar på bröd i sterila glasburkar enligt en av RUDORF (1937) angiven metod.

I vissa försök odlades svampen på klöver varvid materialet i samtliga försök utom ett utgjordes av rödklöverkloner, som massförökats enligt sticklingsmetoden (SYLVÉN 1927, NILSSON och ANDERSSON 1939). De använda klonerna härstammade ur förädlingsmaterial av svensk senklöver och hade följande beteckningar:

K 3	= tidig typ	full blomning	27/6
K 17	= sen »	blomning ej började	27/6
K 22	= » »	» » »	27/6
K 23	= tidig »	begynnande blomning	27/6

I ett infektionsförsök användes några olika klöver- och lucernstammar (Tab. 7).

För de cytologiska undersökningarna fixerades materialet i BOUIN och 2 BD (LA COUR 1931). Jämförande undersökningar visade ifråga om *Sclerotinia* dessa fixeringsmedels tydliga överlägsenhet över NAWASCHIN (olika modifikationer), KARPECHENKO, BOUIN-ALLEN, ZENKER och CARNOY. Sclerotier och apothecieskaft fixerades i outspädd 2 BD; askusstadierna blevo bäst, då detta medel utspäddes med lika stor mängd destillerat vatten. De 2 BD-fixerade preparaten blektes före färgningen under 30 minuter i en stark lösning av klor i 50 % alkohol under direkt belysning. HEIDENHAINS järnalun-hämatoxylin jämte erytrosin i nejlikolja som plasmafärg gav tillfredsställande resultat av flertalet utvecklingsstadier. För kärndelningarna i askus var dock färgning med gentianaviolett något överlägsen. Särskilt goda resultat erhöllos enligt den av OEHLKERS (1940) anvisade metoden. Ett mindre antal preparat färgades enligt FEULGEN's nuklealreaktion, varvid 2 BD- eller ZENKER-fixerat material visade sig vara lämpligast. Specialfärgning av kondriosomer utfördes enligt BENDA och REGAUD F.

II. Sklerotier.

1. Utveckling och histologi.

Föregående undersökningar. Beträffande sklerotiernas bildningssätt föreligga endast kortfattade morfologiska uppgifter i arbeten av REHM (1872) samt NILSSON-LEISSNER och SYLVÉN (1929) m. fl. De färdigbildade sklerotiernas utseende ha däremot ingående beskrivits av ett flertal författare, KÜHN (1870), REHM (1872), ROSTRUP (1890), BREFELD (1891), WADHAM (1925), PAPE (1937) m. fl. Uppgifter angående sklerotiernas histologi saknas.

Egna undersökningar. Utvecklingen av sklerotierna, såväl i värdväxten som på konstgjorda substrat studerades, varvid några ytterligare detaljer utöver REHMS tidigare morfologiska iakttagelser icke framkommo. I detta avseende överensstämmer *S. trifoliorum* med den närstående arten *S. sclerotiorum* Schröt., vars sklerotieutveckling och histologi ingående beskrivits redan av DE BARY (1884).

Mina iakttagelser på levande och fixerat sklerotiematerial av *S. trifoliorum* kunna sammanfattas i följande korta översikt över den histologiska utvecklingen. Det unga, ännu icke mogna sklerotiet består av en homogen,

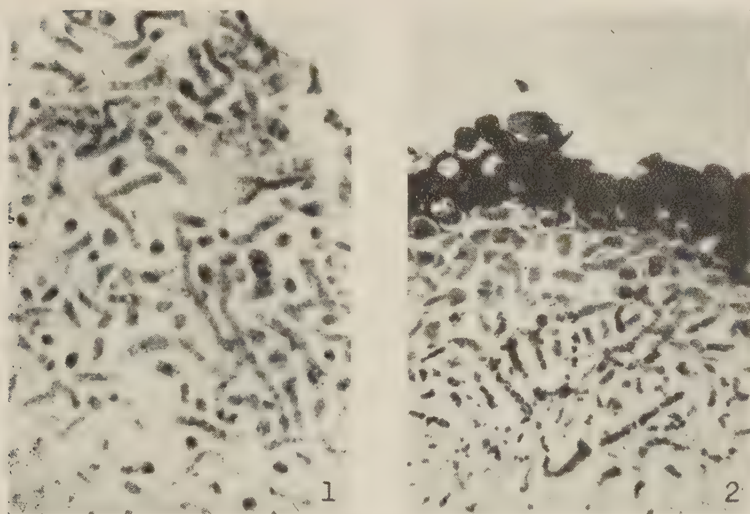


Fig. 1, 2. Snitt genom yngre omoget (1) och äldre moget sklerotium (2).
Schnitt durch jüngeres unreifes (1) und älteres reifes Sclerotium (2).

tämligen lucker prosenkymatisk vävnad av hopflätade, förgrenade hyfer med en cellbredd av 3—5 μ, vilket är något mindre än genomsnittet av motsvarande mått hos det vegetativa mycelet på underlaget. Mellanrummen mellan hyferna äro luft- eller vattenfyllda beroende på fuktighetshalten i omgivningen. Fig. 1 visar ett snitt genom ett ungt sklerotium på detta stadium, där ännu ingen differentiering i bark och märg inträtt; färgen är helt vit i torrt tillstånd och vattenklar vid högre fuktighetshalt. Sedan sklerotiets definitiva storlek uppnåtts genom snabb och tämligen likformig tillväxt med förgreningar och anastomoseringar i de perifera hyferna, sker en differentiering i svart bark och vit märg genom förtjockning och förslemning av respektive hyfmembraner på samma sätt, som angivits för *S. sclerotiorum* av DE BARY (1884).

Barken består hos *S. trifoliorum* av en pseudoparenkymatisk vävnad med 2—3 lager av runda eller något kantiga celler med förtjockade, svartbruna cellväggar. I märgen urskiljas två celltyper, en prosenkymatisk näringsrik och plasmafattig samt en pseudoparenkymatisk, plasmarik. I gränsskiktet mellan dessa finnas celler av övergångstyp, antydande de båda cellslagens gemensamma ursprung från vegetativa hyfer. Näringsvävnaden utfyller den ojämförligt större delen av sklerotiernas inre och överensstämmer strukturellt med märgvävnaden i sklerotier hos övriga *Sclerotinia*arter. Den plasmarika pseudoparenkymatiska vävnaden är belägen omedelbart under barken och i regel begränsad till större eller mindre

fläckar av sklerotiernas yta (subkortikala öar). Denna vävnad består av 3—8 lager av m. e. m. isodiametriska celler. Figur 2 visar ett snitt genom ett moget sklerotium med bark och märgens två olika celltyper. Mellan de plasmarika cellpartierna, vilkas storlek och form variera avsevärt hos olika sklerotier, når den typiska näringsvävnaden ända ut till barken.

I till groning beredda sklerotier bildas, innan några yttre synliga tecken på apotheciebildning förmärkas, i de subkortikala öarna med den pseudoparenkymatiska cellvävnaden initialer till apothecieskaften. Dessa bestå av till en början sfäriska, sedermera mot barken långsträckta hyfknutor av samma utseende och storlek som motsvarande bildningar hos *S. sclerotiorum* (primordier, DE BARY 1884). I ett exakt och med detaljavbildningar försett arbete har redan MATTIROLO (1882) klarlagt utvecklingen av primordierna hos *S. sclerotiorum*, och då mitt material av *S. trifoliorum* överensstämmer väl härmed, har jag ingenting att tillägga. Några entydiga bilder av kärnförhållandena i hyferna på detta tidiga stadium kunde emellertid icke erhållas, beroende på det rika näringsinnehållet i cellerna, vilket omöjliggjorde en tillfredsställande kärndifferentiering i färgade preparat. Av undersökningar av något senare stadier i apothecieutvecklingen att döma äro hyferna i dessa initialer i allmänhet uppbyggda av flerkärniga, vegetativa celler.

2. Groning.

Föregående undersökningar. Experimentella groningsundersökningar ha utförts av WADHAM (1925), som konstaterade dels att en hög fuktighetshalt i det omgivande mediet var nödvändig, dels att sklerotierna hade en avsevärd resistens mot kemikalier och höga temperaturer. Vidare har sklerotiegroningen studerats av HENSON (1935), som visade, att apotheciebildning kan ske från sklerotier härstammande från ensporkulturer. Även PAPE (1937) har undersökt sklerotiernas resistens mot vissa kemikalier, speciellt betningsmedel. Större undersökningar, ur vilka vissa preliminära resultat redan publicerats (HENSON and VALLEAU, 1940) pågå f. n. i U. S. A. Enligt dessa är apotheciebildningen rikligast under oktober—december. Temperaturförsök visade groning vid 4°, 10°, 14° och 18°. Optimum anses vara 14°; maxima och minima angivas icke. Den tid som åtgår innan groningen igångsättes, uppgives vara 15—20 dagar vid optimumtemperaturen. Det framgår dock icke, om denna tid även gäller för nybildade sklerotier. — Större tyska försök angående sklerotiernas groning ha också nyligen publicerats (NICOLAISEN, LEITSCHE und WITZIG 1940). Enligt dessa fordras bl. a. en viss eftermognad på minst 4 veckor innan groningen kan påbörjas, vidare framgår att sannolikt genotypiskt betingade skillnader i groningstiden (= tidrymden från utläggandet i groningsmiljön till apotheciebildningen) förekomma mellan olika stammar.

Normal apothecieutveckling sker endast vid närvaro av ljus (WADHAM 1925, HENSON and VALLEAU 1940). Även för en annan *Sclerotinia*art, *S. ricini* Godf. angivas vissa ehuru icke närmare preciserade ljusförhållanden såsom nödvändiga för denna process (GODFREY 1923).

Egna undersökningar. Under åren 1938—1941 utlades så gott som varje månad sklerotieprov till groning, dels i det fria på eller i marken, dels i växthus eller drivbänkar med i viss mån kontrollerbara ljus- och temperaturförhållanden. Till de tidigare proven användes i regel glasburkar med grus, i vilka fuktigheten vanligen utan svårighet kunde hållas tämligen konstant. Under 1941 har dessutom den av HENSON och VALLEAU (1940) anvisade metoden med 1 % vattenagar i stor utsträckning och med goda resultat använts. Sammanlagda antalet prov, som undersökts på detta sätt, uppgick till omkring 800 med i genomsnitt 10—20 sklerotier per prov. En del av dessa arrangerades såsom ljus- och temperaturförsök med genetiskt enhetligt sklerotiematerial. Under 1940—41 utfördes dessutom ett större försök med två olika biotyper (Sval 17-1 och 10 A-1), avseende en jämförelse mellan groningen i det fria och under laboratorieförhållanden. Varje månad utlades dels nybildade sklerotier, dels sklerotier av en viss bestämd ålder. I det fria planterades sklerotierna i rader i jorden på cirka 1 cm. djup och dessutom placerades på samma platser ur varje försöksled en glasburk med sklerotier på och i sand, i vilken fuktigheten hölls ungefär konstant. Samtidigt utlades burkprov av samma beskaffenhet under vintern i växthuskammare med en temperatur av cirka 18°, under sommaren i en skuggig drivbänk med temperaturen varierande mellan 10° och 25°.

Av dessa i vissa avseenden ännu icke avslutade försök ha tills dato i stort sett följande resultat kunnat utläsas. Några av de ovannämnda tyska och amerikanska försöksresultaten ha kunnat bekräftas. Sålunda grodde vid 15±2° samtliga 10 i ett försök ingående stammar cirka 3 veckor efter utläggningen (jfr. HENSON and VALLEAU). Sklerotierna i detta försök hade en eftermognad på ungefär en månad. Till groning utlagda, nybildade sklerotier i andra försök utvecklades antingen ej alls eller först efter 6—8 veckor (bekräftelse av iakttagelser av NICOLAISEN et al.). Förutsättningen för dessa korta groningstider var förutom lämplig temperatur och fuktighet, vissa ljusförhållanden (se nedan).

Beträffande olika stammars groningstid kunde genom flera jämförande försök med mitt material i regel endast smärre och osäkra skillnader konstateras. Efter samtidig utläggning av sortiment på 25 stammar, som odlats under likartade betingelser i laboratoriet, började groningen med endast några dagars mellanrum i de olika stammarna. Vid upprepning av försöket kunde inbördes förskjutningar mellan stammarna ifråga om tidighetsgrad noteras, och det föreföll, som om okontrollerbara skillnader i förhållandena vid sklerotiebildningen eller i groningsmiljön skulle vara orsaken härtill. Att verkliga om än obetydliga skillnader i tidighet mellan olika biotyper dock förekomma, framgick av det kombinerade fält- och laboratorieförsöket, där i samtliga försöksled den ena biotypen (10 A-1) grodde 3—6 dagar senare än den andra (Sval 17-1).

Temperaturens inflytande. Normal groning erhölls vid temperaturerna 5±2°, 10±2°, 15±2° och 20±2°, vilket i stort sett överensstämmer med HENSON och VALLEAU's resultat. Vid 25±0° utvecklades endast apothecieskaft utan normal skålbildning. Vid 0±2° och 30±0° förekom ingen fruktkroppsutveckling. Sklerotier som förbehandlats vid en temperatur av — 1° under en till tre dagar grodde samtidigt med obehandlade kontroller. Vid en förbehandling vid — 10° under fem till tio dagar syntes däremot en viss försening av groningen inträffa. På så sätt behandlade sklerotier utlades i ett försök jämte obehandlade kontroller i glasburkar vid cirka 18° till groning den 5/3 1939. Kontrollerna grodde 2/4 och de köldbehandlade försöksleden först 8—10/9 samma år, alltså omkring fem månader senare. I detta fall är det emellertid säkert, att denna sistnämnda siffra giver ett alltför stort värde på den osäkra av frysningen framkallade groningsförseningen, emedan de köldbehandlade försöksleden några veckor efter det att kontrollerna hade bildat apothecier, oavsiktligt utsattes för sådana ljusförhållanden, som i och för sig verka hämmande på apothecieutvecklingen.

Ljusets inflytande. I några försök hade jag tillfälle att närmare studera apotheciebildningen under olika naturliga ljusförhållanden. Det visade sig härvid dels att direkt solljus ej är nödvändigt, dels att detta ljus i större kvantiteter verkar hämmande på den normala utvecklingen. Vidare iakttogs att olika apothecietyper utvecklas vid olika ljusmängder. I de här ifrågakommande försöken, som utfördes med sklerotier på fuktig sand eller agar i glasburkar, var fuktigheten i de olika försöksleden lika. Det kunde däremot icke förhindras, att i de försöksled, som periodvis utsattes för direkt solljus, en viss temperaturökning inträffade under dessa perioder. Denna tillfälliga ökning i temperaturen kunde emellertid icke tillmätas något utslagsgivande inflytande i formbildande avseende, enär apothecier av olika typ utvecklades i sådana glasburkar, på vilka den ena hälften var beskuggad och den andra solbelyst. De i det följande angivna ljusvärdena uppmättes med en elektrisk-optisk ljusmätare, typ ELEKTRO-BEWI. Genom en senare anställd jämförelse av detta instrument med en justerad ljusmätare (typ METRUX) överfördes ovanstående tal till lux. De sålunda erhållna värdena äro ganska approximativa men giva ändå en viss uppfattning om storleksordningen av de ifrågavarande ljusmängderna.

I mörker bildades från på marken liggande sklerotier inga apothecieskålar utan endast etiolerade skaft (Fig. 3). Dessa växte ut i olika riktningar m. e. m. vinkelrätt från sklerotieytan. Vid ensidigt insläppande av ljus utförde skaften markerade positivt fototropiska krökningar. I konstant skugga vid ett ljusvärde av 0—10 lux erhölls även etiolerade skaft utan normal skålbildning. Skaften voro dock i dessa fall tjockare än de i mörker bildade, och enstaka visade ansatser till skålbildning. Med stigande ljusmängder, fortfarande i ständig skugga, bildades vid ett ljusvärde av



Fig. 3 7. Ljusets inflytande på apotheciernas utseende. 3 Mörker. 4 Ljusvärde cirka 50 lux. 5 Ljusvärde cirka 500 lux. 6 Ljusvärde cirka 1000 lux plus mycket korta glimtar av direkt solljus. 7 Ljusvärde cirka 1000 lux plus ungefär en halv timmes direkt solljus per dag.

Einfluss des Lichts auf das Aussehen der Apothecien. 3 Dunkel. 4 Lichtwert cirka 50 Lux. 5 Lichtwert cirka 500 Lux. 6 Lichtwert cirka 1000 Lux plus kurze Augenblicke direkten Sonnenlichts. 7 Lichtwert cirka 1000 Lux plus ungefähr eine halbe Stunde direkten Sonnenlichts per Tag.

cirka 50 lux små skålar på långa skaft (Fig. 4), vid ljusvärdet cirka 500 lux större skålar fortfarande på relativt långa skaft (Fig. 5). I de försöksled, som under mycket korta perioder fingo direkt solljus — uppskattningsvis sammanlagt några minuter per dygn —, och i vilka ljusvärdet i övrigt var cirka 1 000 lux voro skaften kortare och apothecieskålarna större (Fig. 6). Vid direkt solljus under en sammanlagd tid av i genomsnitt ½—1 timme per dygn bildades mycket korta skaft eller inga sådana (Fig. 7). Såväl skaft- som apotheciebildningen uteblev helt i groningsprov, som direkt solbelystes under i genomsnitt två timmar eller längre tid per dag. Sklerotier, som uttogos från dessa senare prov och placerades i konstant skugga, bildade apothecier efter 1—2 veckor, vilket visade, att groningsmöjligheterna ej helt undertryckts i de solbelysta proven utan endast tillfälligt hämmats. Det är sannolikt, ehuru jag icke genom exakta försök har kunnat bekräfta det, att icke blott direkt solljus utan även stora ljusmängder överhuvudtaget inverka hämmande på sklerotiegroningen.

Att den förut omnämnda temporära temperaturförhöjningen i de solbelysta proven sannolikt ej heller i fallen av helt inställd apothecieutveckling hade någon inverkan på groningen framgick av ett i laboratoriet utfört försök. Sklerotieprov från tre olika biotyper (Sval 17-1, Sval 45-1, 10 A-1) fingo två timmar per dygn stå i en termostat med glasdörr vid 35±0°, alltså vid en supramaximal temperatur och resten av dygnet vid rumstemperatur (cirka 18°). I dessa prov utvecklades rikligt med normala apothecieskaft av 3—6 mm. längd men inga skålar. Den periodiska temperaturökningen hade alltså i dessa fall förhindrat en fullständig apothecieutveckling men icke skaftbildningen, vilken i de solbelysta proven fullständigt undertrycktes. Det är för övrigt icke troligt, att temperaturen i de under cirka 2 timmar per dag solbelysta hämmade proven vid något tillfälle steg så högt som till 35°, då flertalet av dessa voro täckta av ett vindolitfönster, under vilket luften fick fritt passera. — Normal apotheciebildning skedde slutligen i groningsprov, som utsattes för oavbrutet diffust ljus i form av skugga under dagen och indirekt elektrisk belysning under den mörka delen av dygnet.

Förhållandet mellan ljus och mörker — dagslängden — synes icke utöva något inflytande på apotheciebildningen. Av flera samstämmiga uppgifter i klöverrötelitteraturen att döma, skulle man möjligen kunna misstänka, att *S. trifoliorum* reagerar såsom en kortdagsväxt, då apotheciebildningen enligt dessa uppgifter såväl i naturen som i kultur sker antingen på våren eller på hösten, den senare årstiden dock rikligast och i kultur även under vintermånaderna (NICOLAISEN et al. 1940). Under tiden maj—juli förekommer enligt PAPE (1937) endast ytterst sällan om ens någonsin apotheciebildning (jfr. även NILSSON-LEISSNER och SYLVÉN 1929). Det är dock, som ovan nämnts, icke troligt, att dagslängden utövar något inflytande på

apotheciebildningen, vilken i mina försök förekom under årets alla månader. Två olika försök utförda under naturliga belysningsförhållanden med samma stammar (W 6 och Lu 5) kunna anföras i detta sammanhang. I det ena försöket utlades sklerotierna 12/5, groningen började 1/6, och apotheciebildningen kulminerade 22/6 vid maximal dagslängd. Försöket utfördes i skugga; ljusvärdet uppmättes ej, men kunde uppskattas till 500 lux. I det andra försöket, som utfördes inomhus, utlades sklerotierna 28/11 och groningen började 20/12, alltså vid mycket kort dagslängd. Endast etiolerade skaft utvecklades i detta senare försök på grund av de svaga belysningsförhållandena (cirka 10 lux).

Utvecklingen till fullbildade apothecier, räknat från den tidpunkt apothecieskaften började synas på sklerotiernas yta, skedde emellertid i mina kulturer vid i övrigt lika temperatur- och fuktighetsförhållanden långsammare under den mörkaste delen av året, november—februari. Hos de under denna tid bildade apothecierna voro i regel skaften längre och skålarna mindre och till färgen blekare än normalt. Den långsammare utvecklingen i dessa fall torde emellertid icke direkt bero på den kortare dagslängden utan snarare på de mindre ljusmängderna överhuvudtaget. I starkt skuggade groningsprov under augusti och september erhölls nämligen en liknande förlängning av utvecklingstiden och även liknande utseende på apothecierna.

Betingelserna för apotheciebildningen i naturen äro fortfarande outredda. Då sklerotierna i allmänhet ligga en till ett par cm. djupt i jorden, torde det med ledning av hittills framlagda fakta vara berättigat att antaga, att, förutom temperaturen och den ovan omtalade groningsmognaden, markfuktigheten och syretillgången äro de viktigaste begränsande faktorerna.

3. Sterilitet.

Föregående undersökningar. HENSON och VALLEAU noterade i sina försök, att sklerotierna ur vissa stammar av *S. trifoliorum* icke bildade apothecier. Ingen förklaring lämnas härtill.

Egna undersökningar. I en del av de till groning utlagda sklerotieproven i mitt *Sclerotiniamaterial* bildades inga apothecier. Detta gällde såväl för några av de vegetativt förökade stammarna, vilka voro fullständigt sterila, som för en viss del av ensporkulturerna från de apotheciebildande stammarna. I dessa fall, då ursprungssklerotiernas genetiska sammansättning, deras ålder och eventuella tidigare på apotheciebildningen inverkande miljöinflytelser voro okända, kunde givetvis inga bedömanden göras angående orsakerna till steriliteten. I andra fall, då det i groningsundersökningarna ingående materialet bestod av sporavkommor från i laboratoriet renodlade biotyper, kunde vissa hållpunkter erhållas.

Det visade sig nämligen, att vissa av ensporkulturerna från flertalet i detta avseende undersökta biotyper icke bildade apothecier. Då dessa biotyper voro homokaryotiska och självfertila, låg det till en början närmast till hands att anse denna sterilitet hos vissa ensporkulturer såsom tillfällig och orsakad av smärre variationer i miljöförhållandena antingen under tillväxten i kultur eller under groningen. Den regelbundna förekomsten av partiell sterilitet i flertalet, under noggrant kontrollerade miljöförhållanden, undersökta biotypers avkomma, tillsammans med en del i det följande angivna skäl tyder emellertid på, att det icke var fråga om en tillfällig utan om en bestående, förmodligen konstitutionellt betingad sterilitet.

För att klarlägga skälen för ovanstående uppfattning om den ifrågakommande steriliteten, är det nödvändigt att närmare redogöra för ett par under längre tid studerade fall. Ur två apotheciebildande biotyper, W 6-1 och Lu-1 — ensporavkomlingar från två olika stammar — isolerades i april 1939 12 resp. 8 askosporer, vilka ympades på plattor med näringsagar. De erhållna ensporkulturerna voro i fråga om utvecklingshastighet och sklerotiebildning inom vardera av biotyperna så gott som identiska, vilket med hänsyn till moderapotheciernas homokaryotiska sammansättning även var att vänta. Sedan de olika kulturerna vegetativt förökats genom ympning till ny näringsagar utlades sklerotierna från originalplattorna — cirka 50 per kultur — i juli samma år till groning. I slutet av augusti inträffade apotheciebildning samtidigt i 8 av de 12 från W 6-1 härstammande avkomlingarna och i 7 av de 8 från Lu 5-1. Sklerotierna från de icke apotheciebildande kulturerna fingo kvarligga under lämpliga groningsförhållanden, men hade ännu hösten 1941 — alltså efter mer än två år — icke visat några som helst tecken till groning. Från de vegetativa förökningarna av samtliga 20 ensporkulturer utlades under tiden september 1939—mars 1940 vid fyra olika tillfällen nya sklerotier till groning, varvid exakt samma resultat erhöllos som vid den första groningsundersökningen; de apotheciebildande avkomlingarna bibehöllo sin fertilitet, de övriga voro alltjämt sterila. Sklerotierna i dessa efterprövningar erhöllos vid varje tillfälle från nya vegetativt förökade kulturer; i tre av fallen från normal näringsagar, i ett fall från särskilt näringsrika brödkulturer. De överensstämmande resultaten från dessa upprepade försök utesluta möjligheten av tillfälliga störande faktorers inflytande på vissa led inom originalförsöket och tyda på att den ifrågavarande steriliteten var av bestående art.

Ett annat förhållande gav ytterligare belägg för att verkliga, av allt att döma konstitutionellt betingade skillnader förefunnos mellan de fertila och sterila avkommorna. De senare karakteriserades nämligen av tilltagande och allt mera genomgripande förändringar i olika morfologiska avseenden. Redan efter ett par vegetativa förökningar visade sålunda några

av de sterila formerna avsevärt minskad sklerotiebildning, långsammare myceltillväxt men ökad luftmycelmängd. På den använda näringsagarn förekom hos flertalet stammar och biotyper endast mycket sparsam luftmycelbildning, varför en ökning i detta avseende var mycket iögonfallande. Efter ett tiotal vegetativa förökningar voro samtliga sterila former m. e. m. morfologiskt förändrade. De bildade icke mer normala sklerotier utan i stället enstaka, platta, ihåliga stromata med sklerotieliknande barklager. Efter ytterligare några vegetativa förökningar försvunno även stromabildningarna och i ett par fall inställdes myceltillväxten fullständigt. Samtliga fertila avkommor, som odlats parallellt med de sterila, växte hela tiden fullt normalt. Det existerade således ett tydligt samband mellan steriliteten och den tilltagande degenerationen i kultur. Liknande degenerativa förändringar i kultur ha nyligen i korthet beskrivits hos vissa biotyper av *Septotinia podophyllina* (Ellis & Ev.) Whetz., som tillhör ett nybeskrivet sklerotiebildande, *Sclerotinia* närstående, släkte (WHETZEL 1937). WHETZEL beskriver degenerationen hos dessa biotyper på följande sätt. »The cultures . . . tend to 'run out' (deteriorate or die out) at room temperature after several transfers.» Det förefaller sannolikt, att de ifrågavarande företeelserna hos *Septotinia* och *Sclerotinia* äro av samma art. De morfologiska förändringarna hos de sterila formerna i mina försök förorsakades, så vitt jag kunde iakttaga, icke av några främmande organismer. Vid upprepade tillfällen utförda mikroskopiska kontroller av mycelet visade inga bakterier eller främmande svamparter. En möjlighet, som ej helt kunde uteslutas, var en eventuell infektion av något för *Sclerotinia* patogent, obekant virus i dessa kulturer. Detta föreföll emellertid ytterst osannolikt, dels av den anledningen, att denna infektion i så fall skulle ha skett redan i moderapotheciet och där endast träffat vissa sporer, dels genom det förhållandet att kombinationsförsök mellan sterila och fertila ensporkulturer från olika biotyper gåvo fullt vitala, apotheciebildande mycel, i vilka plasma och cellkärnor från båda kombinationskulturerna blandats (sid. 113). Om den sterila partnern i dessa fall vore virusinfekterad, borde infektionen med största sannolikhet även utsträckt sig till kombinationsprodukten.

I tabell 2 äro iakttagelserna angående sterilitet i sporavkomman från stammar och biotyper sammanställda. Av utrymmesskäl och med hänsyn till i det följande framlagda fakta angående sterilitetens orsak, har icke varje särskilt fall specificerats utan materialet fördelats på tre grupper: stammar, biotyper samt sporavkommor från 2. och 3. apotheciegenerationen inom en ren linje. Sterilitetsprocenten inom varje grupp varierade ungefär lika mellan 10 och 33 %.

Av tabell 2 framgår att den genomsnittliga steriliteten var ungefär lika stor i alla tre grupperna, vilket antyder, att den var av principiellt samma natur såväl hos stammarna som hos biotyperna.

Tabell 2. *Sterilitet inom stammar och biotyper.*

Sterilität innerhalb Stämme und Biotypen.

Ensporkulturer ur: Einzelsporenkulturen aus:	Fertila Fertil	Sterila Steril	Summa Summa	% sterilitet % Sterilität
3 olika stammar .... 3 verschied. Stämmen.	54	15	69	22
6 olika biotyper .... 6 verschied. Biotypen.	77	19	96	20
2. och 3. apotheciegen. i en ren linje 2. und 3. Apotheciengen. in einer reinen Linie.	29	10	39	26

Med anledning av vissa cytologiska iakttagelser (Kap. VIII) blev det möjligt att med en viss grad av sannolikhet påvisa, att yttre omständigheter framkallade steriliteten. Av de cytologiska iakttagelserna framgick nämligen, att ojämnheter i spordifferentieringen uppkommo i apothecier, som avklippts från sklerotierna och lagts till sporkastning. Dessa ojämnheter framträda icke förrän efter några timmar och synas bero på en tidigare störning i den normala askusutvecklingen. Då det spormaterial, som använts för framställande av ensporkulturer till de ovannämnda sterilitetsförsöken uteslutande härstammade från apothecier, som legat till sporkastning 16—24 timmar, föreföll det möjligt, att ett visst samband kunde finnas mellan denna störning och steriliteten. Ett försök med sporuttagning från ett och samma homokaryotiska apothecium på olika tider efter avklippningen från sklerotiet (tab. 3) visade, att alla under de närmaste timmarna kastade sporer gåvo upphov till fertila kulturer och att den partiella steriliteten framträdde först i senare kastade sporer.

Tabell 3. *Sterilitet i sporavkomman från samma homokaryotiska apothecium. (Sval 17—1.)*

Sterilität in Sporenabkommen von demselben homokaryotischen Apothecium. (Sval 17—1.)

Ensporkulturer uttagna efter Einzelsporenkulturen entnommen nach	Antal Anzahl	Grodda Gekeimt	Fertila Fertil	Sterila Steril
1 tim....................................... 1 Stunde	25	24	24	0
6 tim....................................... 6 Stunden	25	23	23	0
12 tim....................................... 12 Stunden	25	25	23	2
24 tim....................................... 24 Stunden	25	23	17	6

Detta försök tillsammans med de i kap. VIII omnämnda cytologiska iakttagelserna visar, att ett samband existerade mellan den yttre störningen av apothecierna och steriliteten hos vissa ensporkulturer. Olika tänkbara förklaringar till den konstitutionella skillnaden mellan fertila och sterila avkommor från samma biotyp diskuteras på sid. 126.

III. Apothecier.

1. Morfologisk och histologisk utveckling.

Föregående undersökningar. Ett flertal arbeten angående apotheciernas morfologiska utveckling hos *S. trifoliorum* finnas, av vilka särskilt må framhållas originalarbetet av REHM (1872), i vilket huvuddragen av svampens utvecklingshistoria klarlagts. Vidare har apotheciebildningen behandlats av JAKOB ERIKSSON (1880), DE BARY (1886), CHESTER (1890), GÜSSOW (1903) samt COLEMAN (1907). Av senare datum äro undersökningar av GILBERT och BENNET (1917), WADHAM (1925), NILSSON-LEISSNER och SYLVÉN (1929), HENSON (1935) samt HENSON och VALLEAU (1940).

Anatomiskt-cytologiska undersökningar av apothecierna ha utförts av GILBERT och BENNET (1917), men resultaten äro mycket knapphändiga, vilket enligt deras egen utsago torde ha berott på bristfällig teknik vid fixeringen av materialet. Även NICOLAISEN et al. (1940) ha påbörjat cytologiska undersökningar, vilka likaledes endast resulterat i några översiktsbilder.

Egna undersökningar. Apothecieutvecklingen har i huvudsak studerats på mikrotomsnittat material, som bildats från sklerotier utlagda till groning i glasburkar med fuktig sand. Samtliga utvecklingsstadier från begynnande skaftbildning till fullt utbildade apothecier fixerades. Snittjockleken var 3—7 μ, i allmänhet 5 μ.

Det första makroskopiskt iakttagbara stadiet i apothecieskaftets utveckling framträder på sklerotiets yta som en m. e. m. konisk utbuktning av 0.1—0.5 mm. längd och en genomsnittlig tjocklek av 0.3 mm. Snitt genom dylika begynnelsestadier visa, att utvecklingen igångsättes från primordierna i den subkortikala tillväxtvävnaden i sklerotiet, där cellerna i ett parti, som motsvarar centrum av den blivande konens basyta, tillväxa meristematiskt. Till en början sker detta i samtliga fall vinkelrätt mot sklerotiets yta. På horisontella eller mot horisontalplanet svagt lutande uppåtriktade delar av sklerotieytan bibehålles denna tillväxtriktning, så att de konformade bildningarna bliva i det närmaste raka. I övriga fall ändras i regel tillväxtriktningen uppåt, så snart utbuktningarna höjt sig över sklerotieytan, vilket resulterar i att konerna bliva sneda och vridna med spetsarna mer eller mindre uppåtriktade. Dessa begynnelsestadier anläggas i ganska stort antal runt hela sklerotiets yta, men endast ett mindre antal av dem utvecklas till fullt utbildade apothecier.

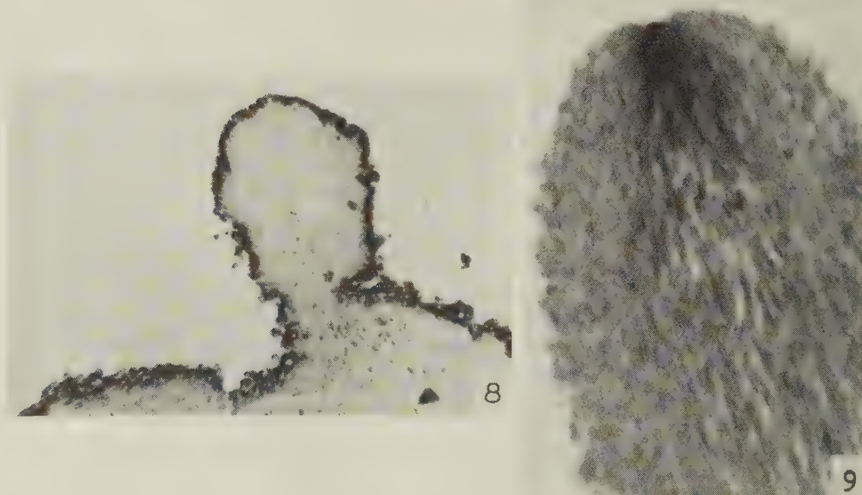


Fig. 8, 9. Längdsnitt genom apothecieskaft. 8 Begynnelsestadium. 9 Toppen av ungt skaft under sträckningsperioden.

Längsschnitt durch Aphothecienstiel. 8 Anfangsstadium. 9 Spitze eines jungen Stieles während der Streckungsperiode.

Vid igångsättningen av utvecklingen spränges förr eller senare sklerotiets bark av ett framväxande cylindriskt hyfknippe, som består av nästan parallella, förhållandevis korta celler, 2 till 3 gånger så långa som breda. I regel förtjockas och sklerotiseras cellväggarna i de perifera hyferna i knippet, så att skaftets begynnelsestadium blir omgivet av ett kortikalskikt, som till sin byggnad helt överensstämmer med sklerotiernas bark (Fig. 8). Sklerotiseringen i detta skikt är stundom mindre tydlig eller uteblir helt, vilket särskilt synes vara fallet hos skaft, som utväxa från sklerotier, som ligga på markytan fritt exponerade mot luften. Denna brist på effektiv skyddsvävnad är sannolikt en kulturföreteelse.

Nästa utvecklingsfas — sträckningen av de positivt fototropiska skaften — sker i raskt tempo. Skaften från underjordiska sklerotier växa m. e. m. rakt i riktning mot markytan. Detta förhållande förefaller egendomligt nog icke vara ett utslag av negativ geotropism, enär skaften från på markytan liggande sklerotier i mörker icke visa en sådan reaktion utan växa i olika riktningar m. e. m. vinkelrätt från sklerotieytan (Sid. 15, Fig. 3). Enligt Norton, Ezekiel och Jehle (Zimmermann 1927) visa äldre apothecieskaft hos *Sclerotinia americana* (Norton & Ezekiel) ej heller några geotropiska krökningar. Dessa författare hålla det dock icke för uteslutet, att yngre stadier skulle visa sig vara geotropiskt mottagliga. Det är möjligt,

att hos *S. trifoliorum* de underjordiska skaftens tillväxtriktning mot markytan bestämmes av deras syrebehov (positiv aerotropism), ehuru jag icke genom försök haft tillfälle att bekräfta detta antagande. Enligt åtskilliga författare är svampen i alla utvecklingsstadier starkt syrebehövande (REHM 1872, WADHAM 1925, POHJAKALLIO 1940 m. fl.).

Från sklerotier, som ligga under markytan, avslutas längdtillväxten i regel, när skaftets spets nått en till ett par mm. ovanför marken. Den ovan markytan befintliga skaftlängden bestämmes av de rådande ljusförhållandena (sid. 16).

Enligt REHM (1872) är maximilängden på skaft från sklerotier i jorden 6 cm., vilket bekräftas av mina försök, i vilka enstaka apothecier utbildades från sklerotier som placerats på 6—7 cm. djup. Från sklerotier på större djup erhölls ingen normal apothecieutveckling. Ett mindre antal skaft anlades visserligen, och en del av dessa utväxte, men några apothecieskålar bildades icke, enär tillväxten avslutades innan skaften nått markytan.

De tillväxande skaften utgöras av cylindriska, mot övre delen något avsmalnande hyfknippen, vilkas diametrar variera från 0.1 till 2.0 mm. På längdsnitt genom unga stadier ser man, förutom en homogen grundvävnad, nära toppen en central grupp hyfer med plasmarika, starkt färgbara, mot skaftets längdaxel något inböjda spetsar (Fig. 9). Längdökningen vid apothecieskaftens sträckning synes ske dels akropetalt genom ovannämnda hyfers spetstillväxt, dels interkalärt genom sträckning såväl i tidigare bildade celler som i efter hand från topphyferna nybildade celler. Hos äldre, medellånga skaft är cellängden i skaftets basala delar, där tillväxten avslutats, 15 à 20 gånger bredden.

De perifera hyferna i skaftet bilda efter hand ett kortikalt skikt, som till sin struktur avviker från sklerotiets och skaftets basala kortikalskikt. Omedelbart under skaftspetsen bildas från hyferna i ytskiktet korta och tjocka förgreningar utåt och uppåt. Från dessa avskiljas som ett yttersta oregelbundet cellskikt, genom att tättliggande tvärväggar nybildas i hyfförgreningarna, olikformade korta celler med distalt avrundade, ofta päronformat förtjockade ytterändar (Fig. 10). Cellväggarna i kortikalskiktet äro tjockare än i övriga delar av skaftet; efter hand inträder också en viss sklerotisering och brunfärgning, vilken dock icke blir så intensiv som i sklerotiebarkens celler.

Förutom ovannämnda tre cellvävnadstyper i apothecieskaften, de plasmarika topphyferna, grundvävnaden med långa rektangulära, nästan parallella, sparsamt förgrenade celler och kortikalskiktet, kan man i de växande skaften urskilja en fjärde celltyp, nämligen speciella näringshyfer, vilka fungera som ledningsbanor för den i sklerotiet upplagrade reservnäringen. Näringshyferna utvecklas först mot slutet av sträckningsperioden, strax

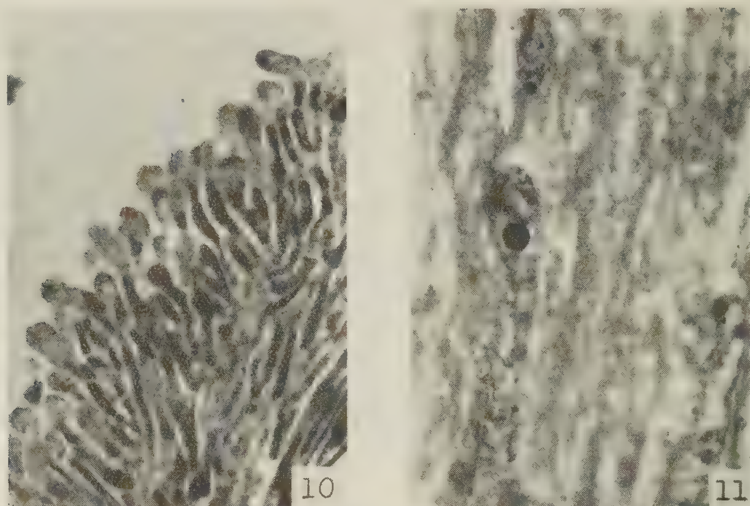


Fig. 10, 11. Detaljer i apothecieskaftens histologi. 10 Det färdiga skaftets kortikalskikt. 11 Näringshyfer.

Einzelheiten in der Histologie der Apothecienstiele. 10 Die Kortikalschicht des ausgebildeten Stieles. 11 Nahrungshyphen.

innan skaftet nått sin definitiva längd; de växa som långa, i tillväxtändan klubblikt förtjockade slangar mellan grundvävnadens hyfer från skaftets bas upp mot vegetationspunkten (Fig. 11). De äro företrädesvis lokaliserade till skaftets yttre tredjedel och förekomma rikligt särskilt i tjockare skaft. Plasman i dessa celler är begränsad till ett tunt skikt, som bekläder insidan av den förtjockade tillväxtändan; tvärväggar förekomma endast sparsamt. Näringsinnehållet i dessa hyfer är ofta koncentrerat i spetsen i form av en eller flera större vätskedroppar, vilka kunna iakttagas såväl i levande som fixerat material (Fig. 11).

Cellkärnorna äro på detta utvecklingsstadium förhållandevis små med en diameter av cirka 1 μ. De uppträda i yngre växande celler i ett antal av 5—20 och äro till formen sfäriska. Ett mindre antal kromatiska kroppar förenade med smala, likaledes kromatiska stråk äro grupperade i periferien av en klar och icke färgbar karyolymfa (Fig. 12). Kärnmembranen är tämligen distinkt. I äldre celler, där kärnantalet genom nybildade tvärväggar ofta är mindre, desorganiseras kärnorna efterhand och försvinna i cytoplasman. Detta sker i grundvävnadens celler utan några märkbara föregående förändringar; i kortikalskiktet bliva kärnorna först pyknotiska och sedan alltmera strukturlösa. Några typiska kärndelningsfigurer iakttogos icke på detta utvecklingsstadium.



Fig. 12, 13. Apothecieskaftets inre vävnader. 12 Grundvävnad. 13 Ursprungshyfer till parafyserna i det blivande subhymeniet. — Hämatoxylin — x 2700.

Die inneren Gewebe des Apothecienstieles. 12 Grundgewebe. 13 Ursprungshyphen zu den Paraphysen in dem zukünftigen Subhymenium — Hämatoxylin — x 2700.

Mot slutet av sträckningsperioden, omedelbart innan apothecieskaften uppnått sin definitiva längd, sker en differentiering i skaftets översta del, vilken makroskopiskt röjer sig genom en tydlig mörkfärgning och en m. e. m. trång, central fördjupning i själva spetsen. Denna differentiering inträder i fruktkroppar, som utvecklas från underjordiska sklerotier, först sedan skaften nått ett stycke över markytan.

Histologiskt sett utmärkes stadiet av att de centrala plasmatiska topphyferna, som tidigare bildat ett kompakt knippe, nu utvecklas till en mera lucker vävnad. Hyfernas förlopp är svagt vågformigt och i de tydliga intercellularrummen förekomma talrika anastomoser mellan cellerna, vilka äro

avsevärt smalare än i grundvävnaden (Fig. 13). Cellkärnorna i detta hyfparti, som i det fullt utvecklade apotheciet bildar det subhymeniala skiktet, äro av samma storlek som grundvävnadens kärnor, men avvika strukturellt från dessa. De bestå av en liten kromatisk centralkropp, omgiven av icke färgbar karyolymfa, vilken avgränsas från den omgivande cytoplasman av en otydlig membran. Samma kärntyp återfinnes i de unga parafyserna. Kärndelningarna äro mitotiska och ske samtidigt för alla kärnor i cellen (Fig. 29). Cellväggarna bildas som transversala septa, oberoende av kärndelningarna med sådana mellanrum, att cellerna bliva 3—5-kärniga. I denna tämligen luckra vävnad, som efter hand uppfyller större delen av skaftspetsen, utväxa parafyserna direkt från i vävnaden ingående hyfer som ett tätt knippe och bekläda med sina terminala ändar insidan av skaftspetsens fördjupning. I samma vävnad differentieras askogoniala celler och askogena hyfer, vilkas utveckling närmare beskrives i avdelning 2 i detta kapitel.

Den sista fasen i apothecieutvecklingen, utbredningen av själva apothecieskålen, börjar med ett centralt uppväxande av parafyser och enstaka aski, varvid den för föregående stadium karakteristiska trånga fördjupningen av skaftspetsen i regel till största delen försvinner och ersättes av en i det närmaste plan yta bestående av det unga hymeniet. Detta begränsas utåt av en smal överskjutande kant av skaftets kortikalskikt. Denna grunda skålform hos *S. trifoliorum* angives av Rehm (Rabenhorsts Kryptogamenflora III p. 818) vara en artkaraktär, genom vilken man lätt kan skilja denna svamp från den närstående arten *S. sclerotiorum,* hos vilken en central trattformig fördjupning kvarstår även hos det fullt utvecklade apotheciet. I det stora kulturmaterial av apothecier, som jag hade till mitt förfogande, uppträdde emellertid ej så sällan — uppskattningsvis i en frekvens av ett par procent — apothecier, vilka under hela tillväxtperioden bibehöllo den trattformiga fördjupningen i apothecieskålen. Även bland det insamlade fältmaterialet återfanns dylika typer, varför ett enbart på denna artkaraktär grundat särskiljande av de båda *Sclerotinia*-arterna ej är fullt tillförlitligt. Säkra artskillnader äro däremot bl. a. askosporernas olika storleksordning samt det förhållandet, att de mogna sporerna hos *S. trifoliorum* äro fyrkärniga, hos *S. sclerotiorum* däremot endast tvåkärniga.

Vid den fortsatta utvecklingen av hymeniet hos *S. trifoliorum* nybildas aski och parafyser dels i centrum av apothecieskålen, dels successivt mot periferien från det lateralt utväxande subhymeniala skiktet, vilket består av ett nätverk av ursprungshyfer till parafyserna med tämligen glest insprängda askogena hyfer. Utåt begränsas det subhymeniala skiktet av grundvävnadshyfer från skaftet, av vilka de yttre bibehålla sin meristematiska karaktär. Dessa tillväxa i lateral riktning utanför subhymeniet och

utbilda på apothecieskålens undersida ett kortikalskikt, som till sin byggnad överensstämmer med skaftets.

Utvecklingen av hymeniet karakteriseras av en snabb och riklig utveckling av aski och parafyser. Till denna förbrukas givetvis stora näringsmängder, vilka i första hand och huvudsakligen synas ersättas genom näringshyferna, som på detta stadium växa genom grundvävnaden, framförallt i skaftets yttre partier, till det subhymeniala skiktets undre och yttre delar. Senare utnyttjas även cellinnehållet i grundvävnadshyferna i skaftet med början i de inre delarna, vilka efter hand fullständigt tömmas. Till slut anlitas för utvecklingen av de sista aski även cellinnehållet i det subhymeniala skiktet och parafyserna. På snitt genom äldre apotheciestadier ser man följaktligen i samtliga vävnader utom i aski endast tomma celler med mer eller mindre insjunkna cellväggar.

Med tilltagande ålder inträda även vissa förändringar i apotheciernas form och färg. Hymeniets plana yta blir hos en del apothecier konvex och efter slutad sporbildning äro skålkanterna ofta nedvikta. Färgen, som från början varit ljust gulbrun (kanelbrun), mörknar allt mera och blir hos övermogna apothecier slutligen svart. Stundom äro apothecierna under en kortare, övergående period i samband med den avtagande sporproduktionen överdragna av ett vitt puder, bestående av mikrokonidier, som bildats från på hymeniets ovansida liggande askosporer.

Den tid, som åtgår från det första makroskopiskt iakttagbara framträdandet av apothecieskaftens konformade begynnelsestadier på sklerotiernas yta tills apothecieskålen uppnått sin definitiva storlek, varierar avsevärt med de rådande ljus- och temperaturförhållandena. Vid ett temperaturområde med minimum + 10° (på natten) och maximum + 18° (mitt på dagen) och indirekt dagsljus med ljusvärden omkring 500 lux är denna tid i genomsnitt 10—12 dygn. Utvecklingen av fruktkropparna sker dock icke med en över denna tid likformigt fördelad jämn hastighet utan i en viss rytm. De m. e. m. sklerotiserade begynnelsestadierna växa sålunda under de 4—6 första dygnen mycket obetydligt, varefter en rask sträckning av skaften sker med en hastighet av bortåt 10 mm. per dygn. Sedan skaftens definitiva längd uppnåtts, inträder i samband med differentieringen i skaftspetsen ett långsammare skede i utvecklingen, vilket varar ett par dygn. Utbredningen av apothecieskålen försiggår därefter i raskt tempo under 1 à 2 dygn beroende på skålens slutgiltiga absoluta storlek. Sporproduktionen i de större apothecierna varar under dessa miljöförhållanden 3—5 veckor.

2. Askogena hyfer.

Föregående undersökningar. De askogena hyferna hos *S. trifoliorum* ha icke förut studerats. Hos en annan *Sclerotinia*art nämligen *S. Fuckeliana* de Bary be-

skrives utvecklingen av den dikaryotiska fasen ganska summariskt. Tvåkärniga hyfceller angivas uppkomma i det blivande hymeniet genom anastomoser mellan vegetativa hyfer (Kharbush 1927). Att döma av texten och figurerna i denna skrift förefaller det, som om aski direkt bildades från dessa tvåkärnceller. Den dikaryotiska fasen skulle alltså vara ovanligt kort, och askogena hyfer i egentlig mening saknas. Detta förhållande är ganska märkligt och avviker väsentligt från mina iakttagelser hos *S. trifoliorum*, *S. sclerotiorum* Schröt och *S. borealis* Bubák & Vleugel, vilka i det följande komma att beskrivas. Med hänsyn till det faktum, att *S. Fuckeliana* i systematiskt och anatomiskt hänsende står nära *S. trifoliorum* och *sclerotiorum* håller jag det för troligt, att Kharbush's iakttagelser beträffande den dikaryotiska fasen hos ifrågavarende *Sclerotinia*art icke äro riktigt tolkade.

Vidare ha på ett begränsat material slutstadierna i den askogena hyfutvecklingen hos ytterligare en *Sclerotinia*art nämligen *S. tuberosa* Hedw. studerats (Nardi 1930). Askusutvecklingen antages hos denna art ske enligt *Geopyxis catinus*-typen. Nardi påpekar särskilt, att han icke kunde iakttaga vanliga terminala askomycethakar, men på grund av det begränsade materialet kunde inga säkra slutsatser dragas om utvecklingsmekanismen. Det framgår emellertid, att de askogena hyferna hos denna art bestå av flera celler.

Egna undersökningar. *Sclerotinia trifoliorum* saknar differentierade sexualorgan. Den dikaryotiska fasen, som föregår askusbildningen, är däremot välutvecklad och består av askogena hyfer, vilka utväxa från obetydligt förändrade vegetativa celler.

Ursprungscellerna till de askogena hyferna, som i det följande för korthetens skull benämnas askogoniala celler, bildas oberoende av varandra på många olika ställen i apothecieskaftets centrala vävnad. Deras härstamning från vanliga, odifferentierade vegetativa hyfer är i många fall otvivelaktig, även om det i regel är svårt att exakt spåra deras anatomiska ursprung i den täta vävnaden av snabbt tillväxande hyfer.

Anläggningen av askogena hyfer från enstaka celler eller cellgrupper på olika punkter inom samma fruktkropp synes vara en tämligen allmän företeelse inom de högre *Pezizales*familjerna. Hos de i allmänhet ontogenetiskt och cytologiskt bättre kända primitivare familjerna (*Pyronemaceæ*, *Ascobolaceæ*, *Pezizaceæ*) sker som bekant utvecklingen av de askogena hyferna från ett enda befruktat eller obefruktat askogonium i varje fruktkropp. Hos representanter för högre stående familjer (*Rhizinaceæ*, *Geoglossaceæ*) anläggas flera, ofta enklare askogon i varje fruktkropp ex. *Rhizina undulata* (Fitzpatrick 1917, 1918), *Spathularia velutipes* (Duff 1922), *Mycogalopsis retinospora* (Giurasin 1925). Andra arter t. ex. *Trichoglossum hirsutum* (Duff 1922) utmärkas av fullständig tillbakabildning av askogonen; de askogena hyferna bildas från odifferentierade hyfer.

Fördelningen av den dikaryotiska fasens ursprung på flera olika punkter inom samma fruktkropp synes gå i stort sett parallellt med den av Gäumann (1928) påvisade morfologiska tillbakabildningen av sexualorganen såväl inom olika *Pezizales*familjer som inom hela gruppen *Pezizales*.



Fig. 14—16. Askogoniala celler. — Hämatoxylin — x 2700.
Ascogoniale Zellen. — Hämatoxylin — x 2700.

a. *Den dikaryotiska vävnadens utveckling.*

De askogoniala cellerna hos *S. trifoliorum* utmärkas av en tätare, mera färgbar cytoplasma och en tydligt markerad tillväxt i lateral riktning, vilket gör dem kortare och bredare än de kringliggande vegetativa cellerna. I tidigare stadier bestå de av enstaka terminala eller interkalära celler. Senare bildas ofta tvärväggar i dessa, så att två förhållandevis korta ovanför varandra liggande celler uppkomma (Fig. 14, 15). I undantagsfall bildas dylika dubbelceller i omedelbar närhet av varandra (Fig. 16).

Kärnorna äro blott obetydligt större men starkare färgbara än i de omgivande hyferna; till antalet 4—8 i varje cell. De synas till en början ha i stort sett samma struktur som parafyskärnorna, d. v. s. en förhållandevis liten kromatisk centralkropp med ett omgivande ljust skikt av karyolymfa, som är avgränsat från den omgivande cytoplasman genom en otydlig kärnmembran. De kromatiska kropparna tilltaga snabbt i storlek, och då kärnorna senare utvandra i de askogena hýferna, utfylla centralkropparna större delen av kärnvolymen, så att endast ett smalt omgivande skikt av icke färgbar kärnsubstans återstår. Redan på detta stadium kan en m. e. m. tydlig parvis gruppering av kärnorna iakttagas (Fig. 15, 16).[1]

[1] Uppkomsten av tvåkärnstadiet hos de högre svamparna betecknas av Buller (1930, 1931) som »diploidisation», av Brodie (1934) som »dikaryotisation». Den förstnämnda termen har allmänt accepterats för hymenomyceter och jästsvampar (Buller 1941). Även för några högre askomyceter har »diploidisation» använts (Dodge 1932, 1935). Beträffande *S. trifoliorum* må det redan här framhållas, att denna process kan ske såväl i homo- som i heterokaryotiska hyfer i fruktkroppens skaft.

I detta sammanhang kan det vara lämpligt att närmare diskutera frågan om dessa kärnors inre byggnad. Det är en ganska allmän företeelse, att den synliga strukturen av de med gängse fixerings- och färgmedel behandlade kärnorna hos askomyceterna såväl i en del vegetativa vävnader som i de askogena hyferna ter sig som en sfärisk kromatisk centralkropp med ett ljust omgivande skikt av icke färgbar substans. (RAYMOND 1934, GWYNNE-VAUGHAN and BARNES 1937). Detta gäller för kärnor under vilstadium. Frågan är nu, om den starkt färgbara centralkroppen innehåller endast nukleolär substans, eller om den är av komplex natur och består av såväl nukleol som karyotin (den senare termen enligt LUNDEGÅRDH, 1910). I det förstnämnda fallet är man tvungen att antaga, att karyotinet befinner sig i ett icke basikromatiskt tillstånd, vilket i och för sig icke är osannolikt. Enligt min uppfattning är det dock mest troligt, att det sistnämnda fallet, centralkroppen bestående av nukleol jämte karyotin, är det riktiga. De askogena hyfkärnorna hos *S. trifoliorum* äro nämligen färgbara enligt FEULGEN's nuklealreaktion, varvid centralkropparna antaga visserligen svag, men dock märkbar röd färgton. Detta tyder på närvaron av thymonukleinsyrehaltigt material inom eller på ytan av dessa kroppar. I samband med den följande karyogamin vid askusbildningen förlora centralkropparna sin Feulgenfärgbarhet och samtidigt uppträda i kärnan ett normalt basikromatiskt trådsystem. Likartade observationer ha tidigare gjorts hos en annan askomycet, nämligen *Ascobolus stercorarius* (BJÖRLING 1941).

Som ovan framhållits, hänföra sig emellertid de ifrågavarande kärnbilderna till fixerat material, och det är ej osannolikt, att kärnorna i levande tillstånd ha ett i karyolymfan utbrett känsligt karyotinnät, som vid fixeringen kontraheras till nukleolens yta. Detta skulle i så fall ske med åtskilliga av de vanliga fixeringsmedlen, av vilka flertalet tidigare använts (RAYMOND 1934, GWYNNE-VAUGHAN och BARNES 1937). En jämförelse med icke fixerade cellkärnor är svår, då dessa i levande material icke äro synliga och vitalfärgning icke giver tillfredsställande resultat. Hos en del askomyceter äro emellertid de askogena hyfkärnorna även i fixerat och färgat material differentierade i nukleol och karyotin. I dessa fall är tydligen kärnstrukturen mera stabil. Exempel härpå äro förutom *Humaria rutilans* (GUILLERMOND 1911, WILSON 1937), som med sina exceptionellt stora och karyotinrika cellkärnor tillsvidare intager en särställning, *Geopyxis catinus* och *Acetabula leucomelas* (GUILLERMOND 1904, 1905). Dessa fall göra det sannolikt, att de hos flertalet av de cytologiskt undersökta askomycetarterna vanligen observerade bilderna av de askogena hyfkärnorna — kromatisk centralkropp med ljust omgivande skikt — äro av fixeringen framkallade konstprodukter, och att dessa kärnor i levande tillstånd äro utrustade med ett normalt i kärnrummet utbrett karyotinnät.

Beträffande härstamningen av kärnorna i de askogena hyferna hos *S. trifoliorum*, så måste de, om man bortser från möjligheten av en eventuell befruktning genom mikrokonidier under apothecieskaftets tidigare utveckling, vilket senare kommer att diskuteras (sid. 69), vara avkomlingar från kärnor i en eller flera celler i sklerotiets subkortikala tillväxtskikt. Dessa härstamma i sin tur från det vegetativa homo- eller heterokaryotiska mycel, som bildat sklerotiet. Såväl vid sklerotiebildningen som senare i det subhymeniala skiktet förekomma talrika anastomoser. I fixerat material kunde i en del av dessa anastomoser kärnor iakttagas. I den subhymeniala vävnaden, i omedelbar anslutning till de askogoniala cellernas bildningsort observerades stundom anrikning av kärnor vid den ena och ett fåtal eller inga alls vid den andra ändan av sådana anastomoser. Detta tyder på, att dylika transportmöjligheter från en hyf till en annan verkligen utnyttjats. Liknande iakttagelser beträffande mycelfusioner och transport av kärnor genom anastomoser i subhymeniala skikt hos askomyceter, som sakna differentierade sexualorgan, ha tidigare gjorts hos *Neurospora sitophila* (SCHÖNEFELDT 1935) och *Humaria rutilans* (WILSON 1937). Hos den förstnämnda arten antages denna kärntransport säkra eller åtminstone underlätta sammanförandet av »sexuellt» olika kärnor i dikaryofasen. Det är dock icke klart, om icke dessa kärnor redan tidigare konfronterats med varandra i cellerna i de vegetativa hyfer, som bildat fruktkroppen. Beträffande *S. trifoliorum* anser jag det icke troligt, att om genotypiskt olika kärnor finnas i apotheciets vävnader, dessa först på ett så sent stadium som i det blivande subhymeniet skulle sammanföras i samma cell. Om apotheciet bildats från ett sklerotium ur ett heterokaryotiskt mycel, finnas de olika kärnorna högst sannolikt från begynnelsen av fruktkroppsutvecklingen i samma celler. Även i det fallet, att det sklerotium, ur vilket apotheciet utväxer, bildas av två genotypiskt olika mycel, förefaller det på grund av den rikliga anastomosbildningen vid sklerotiets tillväxt mest sannolikt, att kärnblandningen redan då inträffar. Det ligger närmast till hands att tolka anastomoserna, i varje fall de inom fruktkroppen hos *S. trifoliorum*, såsom organ, vilka ha till uppgift att säkerställa balansen i närings- eller plasmatillgången i olika delar av apothecievävnaderna.

De askogena hyferna utväxa mer eller mindre lateralt antingen från den ena eller från båda askogoniala cellerna, medförande ett à två tydliga kärnpar (Se fig. 14—16). Tillväxtriktningen blir efter hand parallell med parafysernas. I den följande utvecklingen kunna två efter varandra följande och morfologiskt skilda stadier urskiljas. Gemensamt för båda stadierna är, att kärndelningsmekanismen är så inrättad, att de båda kärnorna i den terminala cellen (eller den terminala delen av den översta cellen) icke bliva systerkärnor utan avkomlingar från var och en av kärnorna i det ursprungliga paret. Detta sker dels genom att delningarna för-

siggå simultant, dels genom att kärnorna före och under delningarna intaga bestämda positioner i cellerna. (»Konjugerade delningar», POIRAULT et RACIBORSKY, 1895, betr. *Uredinales.*) I det följande betecknas hyferna i de två utvecklingsstadierna såsom första hyftypen (Fig. 17—22) och andra hyftypen (Fig. 23—28).

I den första hyftypen ligga under delningarna de båda kärnorna i jämnhöjd med varandra i ett plan vinkelrätt mot längdaxeln i den avlångt rektangulära hyfcellen (Fig. 18). Delningar i kärnparen förekomma i de två –tre översta cellerna, och såväl den terminala som underliggande celler bliva således under övergående perioder fyrkärniga (Fig. 19, 21, 22). Då det ursprungliga kärnparet intager ett dylikt bestämt utgångsläge, innan delningen igångsättes, måste kärnspolarna vara m. e. m. parallella med cellens längdaxel, och dotterkärnorna fördelas så, att i det terminala och basala kärnparet icke-systerkärnor ingå. I regel bildas senare cellväggar mellan dotterkärnparen som transversala septa (Fig. 20—22). Under den tvåkärniga cellens tillväxt mellan delningarna ligga kärnorna ovanför varandra (Fig. 21).

Trots att inga tydliga kärndelningsfigurer kunde iakttagas på detta utvecklingsstadium, måste delningarna av följande skäl antagas försiggå enligt detta schema. I intet fall lågo de fyra dotterkärnorna i en cell i rad ovanför varandra, utan de bildade städse en mer eller mindre kvadratisk figur (Fig. 19). En dylik kärnkonstellation skulle, om den skett i två ovanför varandra liggande kärnor endast vara möjlig med två transversala kärnspolar, vilket emellertid är ytterst osannolikt bl. a. av den anledningen, att stadier som tydde på profas i kärnorna endast observerades, då dessa lågo i jämnhöjd med varandra (Fig. 18).

De närmare detaljerna i den mekanism, som tvingar de båda kärnorna i jämnhöjd med varandra, innan den simultana delningen inledes, är oklar. Möjligen kunna för kärnorna gemensamma kroppar, tjänstgörande som vid delningen riktningsbestämmande element spela en roll i detta sammanhang. Två centrosomliknande, extranukleära kroppar kunde nämligen i en del preparat iakttagas mellan de båda kärnorna under deras förflyttning till utgångsläget för delningen (Fig. 17). Dessa extranukleära kroppar vandrade sedan mot spetsen och basen av cellen till punkter, som lågo på ungefär en kärndiameters avstånd från kärnparet, och som sedermera ockuperades av de båda dotterkärnparen (Fig. 18). Dessa iakttagelser jämte det förhållandet, att de ifrågakommande extranukleära kropparna synas vara till form och uppträdande permanenta cellbeståndsdelar, tyder på, att de möjligen kunna spela en viss roll som orienterande organ vid de simultana delningarna.

Hyfernas bredd är på detta stadium i de aktiva övre cellerna cirka 2.5 μ så att de båda kärnorna, vilkas diameter är cirka 1.2 μ (kromatinkropp plus



Fig. 17—22. Askogena celler i första hyftypen. — Hämatoxylin — 17-20 x 2700; 21, 22 x 1800.

Ascogene Zellen in der ersten Hyphentype. — Hämatoxylin — 17-20 x 2700; 21, 22 x 1800.

omgivande karyolymfa), vanligen utan större svarighet kunde ligga bredvid varandra. I äldre celler, vilka ofta äro enkärniga, är bredden avsevärt större; vakuoler uppträda rikligt i plasman och kärnorna visa tecken på begynnande degeneration (Fig. 22).

Denna speciella typ av simultan kärndelning synes hittills icke ha iakttagits hos askomyceterna. Överhuvud taget är ganska litet känt om mekanismen vid de simultana delningarna i tidigare stadier av den askogena hyfutvecklingen. Hos mera noggrant undersökta arter t. ex. *Pyronema confluens* (Claussen 1907, 1912), där man kan följa de askogena hyferna i hela deras utveckling, finnas som bekant två morfologiskt skilda stadier, ett primärt cönocytiskt med flera kärnpar och ett sekundärt med hakbildning och endast ett kärnpar i varje cell. Claussen har hos *P. confluens* iakttagit och avbildat kärndelningar i det primära stadiet. Vid metafasen ligga de båda kärnorna i paret ett gott stycke ovanför varandra, men under telofasen förändras delningsfigurernas inbördes läge sålunda, att de slutligen mycket utdragna kärnspolarna komma att ligga vid sidan av var-

andra och i det närmaste parallella. Härigenom uppnås vid den simultana delningen samma resultat som hos *S. trifoliorum*, d. v. s. en bestämd fördelning av dotterkärnorna, men själva delningsmekanismen är dock i så måtto olika hos de båda arterna, att kärnorna i utgångsläget för delningen hos *Pyronema* alltid ligga ovanför varandra, hos *Sclerotinia* däremot bredvid varandra.

En uppdelning i primära och sekundära askogena hyfer har vidare angivits gälla för andra askomycetgrupper; mest utpräglat är förhållandet hos *Plectascales* (DANGEARD 1907). Huvudvikten har i tidigare undersökningar i regel lagts vid morfologien och kärnförhållandena i slutstadiet av de askogena hyfernas utveckling, alltså omedelbart innan askusbildningen. I de fall där tidigare stadier kunnat undersökas, ha delningarna i kärnparen angivits som simultana (konjugerade) utan närmare beskrivning av förloppet. Åtskilliga morfologiskt skilda typer av de askogena hyfernas slutstadier ha beskrivits. Enligt GÄUMANN-DODGES sammanställning (1928) kunna fem olika urskiljas. Härtill kommer en ny typ hos *Arachnopeziza aurelia* beskriven av RAYMOND (1934) samt ytterligare ett par nya typer hos *Sordaria* och *Tuber* (GREIS 1938).

Den ovan beskrivna utvecklingstypen hos *S. trifoliorum* överensstämmer icke med någon av dessa. Den visar däremot stora likheter med de simultana delningarna i den dikaryotiska fasen hos vissa basidiomyceter. Exempel härpå utgöra sådana autobasidiomyceter, vilka i det sekundära mycelet sakna de bågliknande bildningarna (ty. Schnallen, eng. clamps) vid cellernas tvärväggar, såsom *Corticium bombycinum* (KNIEP 1913). Hos denna art ske de simultana delningarna på samma sätt som hos *S. trifoliorum*, nämligen med de båda kärnorna i jämnhöjd med varandra i ett plan vinkelrätt mot hyfens längdaxel. Simultan kärndelningsmekanism av liknande typ återfinnes vidare i tvåkärnstadiet hos uredinéerna (SAPPIN-TROUFFY 1896, MOREAU 1914).

I det andra skedet av de askogena hyfernas utveckling (= andra hyftypen, Fig. 23—28), som avslutas med askusbildning, inträffa före kärndelningarna vissa bestämda morfologiska förändringar i de tvåkärniga hyferna. Utvecklingstypen synes liksom den föregående ej förut vara närmare beskriven hos någon askomycetgrupp, varför den i det följande utförligt kommer att behandlas. Den företer vittgående likheter med kärn- och celldelningsmekanismen i autobasidiomyceternas sekundära mycel. I den terminala cellen i de askogena hyferna bildas mellan de båda ovanför varandra liggande kärnorna en lateral utbuktning (Fig. 23, 25), till vilken en av kärnorna vandrar. Tillväxtriktningen i den laterala utbuktningen blir

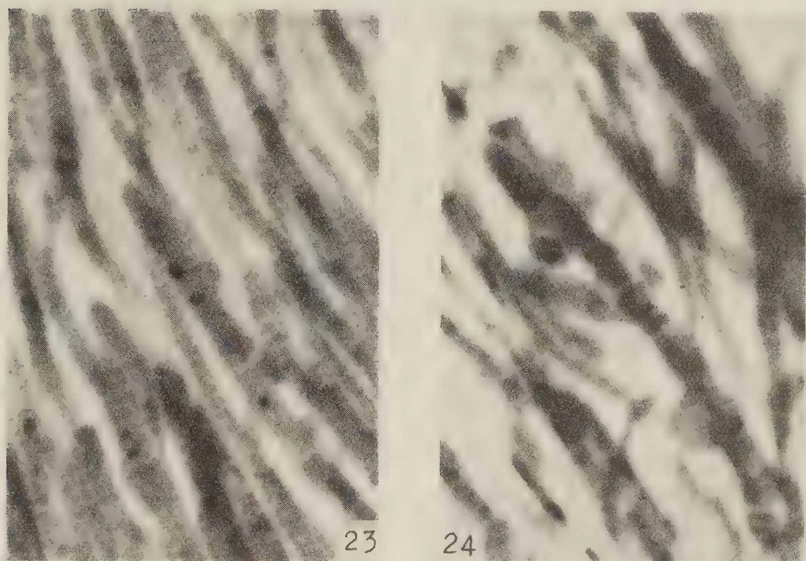


Fig. 23, 24. Askogena celler i andra hyftypen. — I fig. 23 observeras den laterala utbuktning, som senare utväxer till båge. — Hämatoxylin. — x ca. 2000.

Ascogene Zellen in der zweiten Hyphentype. — In Fig. 23 beobachtet man die laterale Ausbuchtung, die später zur Schnalle auswächst. — Hämatoxylin. — x ca. 2000.

successivt allt mera basal, så att den medföljande kärnan inom kort befinner sig ungefär i jämnhöjd med den i huvudcellen. På detta stadium sker den simultana delningen med i stort sett parallella kärnspolar (Fig. 26). Två extranukleära, starkt färgbara kroppar, en vid vardera kärnan, uppträda, liksom vid kärndelningarna i föregående utvecklingsstadium, även nu under kärnornas förflyttning till utgångsläget för delningen (Fig. 25). Ehuru det ej var möjligt att i detalj följa den vidare utvecklingen av dessa extranukleära kroppar, tyder deras regelbundna uppträdande i detta moment på att de på något sätt äro engagerade i den simultana delningen. Mellan de båda dotterkärnorna i huvudcellen bildas en transversal cellvägg omedelbart under den laterala allt mera bågformade utbuktningen. Mellan kärnorna i bågen sker detta endast i undantagsfall. De båda övre dotterkärnorna konstituera den nybildade terminala cellens kärnpar, i vilken antingen samma delningsprocess upprepas, eller kärnfusion sker, och cellen utväxer till askus.

Den enkärniga bågformade utbuktningens spets sammansmälter med den subterminala cellen. Om den terminala cellen bibehåller sin karaktär av vanlig askogen hyfcell och vidareutvecklas under simultana delningar, invandrar kärnan från bågen i den subterminala cellen, vilken sålunda åter

blir tvåkärnig. Genom att den terminala cellen tillväxer under upprepade delningar av denna typ, uppkomma askogena hyfer av ansenlig längd med bågformade förbindelser mellan de tvåkärniga cellerna (Fig. 24, 27). Förgreningar av de askogena hyferna äro i detta stadium ganska vanliga (Fig. 28). De bildas därigenom, att bågen mellan den terminala och subterminala cellen utväxer till en självständig hyf medförande bågkärnan och kärnan från den subterminala cellen. Sidogrenen bildar till en början en spetsig vinkel med huvudhyfen men växer senare m. e. m. parallellt med denna. Kärn- och celldelningarna äro lika i sidogrenar och huvudhyfer. När den terminala cellen slutligen utväxer till askus, utvandrar kärnan från den subterminala cellen till bågen, som därigenom blir tvåkärnig och antingen direkt bildar en ny askus (undantagsfall) eller genom simultana delningar enligt ovan beskrivna schema giver upphov till ett knippe av aski, s. k. transitorisk askusbildning.

Antalet aski, som på detta sätt kunna bildas från spetsen av varje askogen hyfförgrening, förefaller vara avsevärt och begränsas sannolikt endast av tillgången på näring i den omedelbara omgivningen av askusknippets bas. Figur 30 visar fyra aski i olika utvecklingsstadier härstammande från samma terminala, askogena hyfcell. Avvikelser från det ovan skisserade utvecklingsschemat vid den transitoriska askusbildningen äro ej sällsynta. De uppkomma därigenom, att någon eller några av de tvåkärneceller, som skulle givit upphov till aski av högre ordningsnummer, i stället utväxa till två eller flercelliga askogena hyfer med normala bågar innan askusbildningen sker (Fig. 31). Transitorisk askusbildning av i princip liknande typ men utförd med hjälp av vanliga askomycethakar är en tämligen allmän företeelse hos de högre askomyceterna; *Pyronema confluens* (CLAUSSEN 1912), *Arachnopeziza aurelia* (RAYMOND 1934), *Humaria rutilans* (WILSON 1937) m. fl.

En jämförelse mellan de båda askogena hyftyperna hos *S. trifoliorum* visar förutom de iögonenfallande morfologiska skillnaderna även en del andra olikheter. I den första typen förekomma kärndelningar i de två till tre översta cellerna, och tillväxten är såväl apikal som interkalär; de äldre cellerna växa såväl på längden som på bredden. Direkt askusbildning från askogena hyfceller av denna typ synes icke förekomma. Förgreningar i hyferna observerades ej heller. I den andra askogena hyftypen, som avslutas med askusbildning, äro kärndelningarna begränsade till den terminala cellen, och tillväxten är mera utpräglat apikal, i det att endast de två översta cellerna visa längdtillväxt. Cellstorleken är, sedan de subterminala cellerna åter blivit tvåkärniga, tämligen konstant. Förgreningar av hyferna förekomma tämligen rikligt i denna typ.

Vad beträffar förhållandet mellan de båda hyftypernas utbredning, så är detta svårt att exakt bestämma, då det ej är möjligt att följa hyferna längre

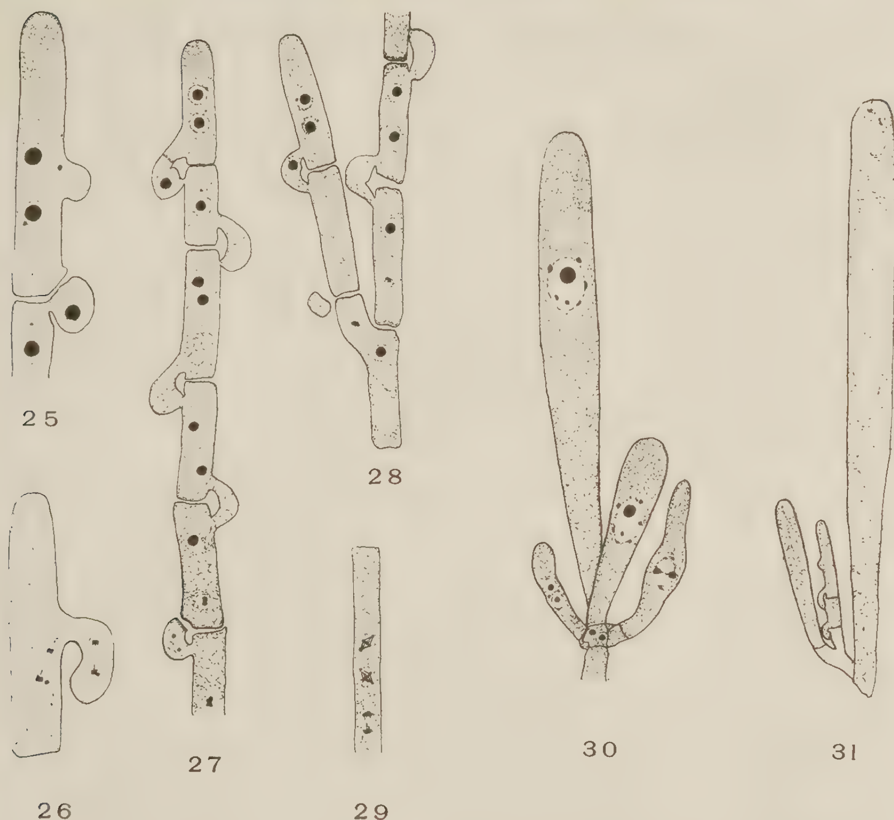


Fig. 25—31. 25—28 Askogena celler i andra hyftypen. 29 Mitoser i vegetativ hyf. 30, 31 Transitorisk askusbildning. (31 ofärgat levande material). Hämatoxylin 25, 26, 29 x 2700; 27; 28 x 1800; 30, 31 x 1000.

25—28 Ascogene Zellen in der zweiten Hyphentype. 29 Mitosen in vegetativer Hyphe. 30, 31 Transitorische Askusbildung. (31 ungefärbtes lebendes Material). — Hämatoxylin — 25, 26, 29 x 2700; 27, 28 x 1800; 30, 31 x 1000.

sträckor i det snabbt tillväxande subhymeniala skiktet. Svarigheterna ökas även genom att de båda typerna icke förekomma samtidigt utan följa efter varandra. De äldre hyfcellerna tömmas också efter hand på sitt innehåll och desorganiseras. Askogena hyfer av båda typerna med en längd av bortåt 100 μ och bestående av ett tiotal celler kunde emellertid iakttagas i flera preparat. Stora variationer i varje fall i fråga om längden av den andra hyftypen synas förekomma även i apothecier, som utvecklats under fullt normala yttre förhållanden. Under det att i en del preparat askusbildning iakttogs redan efter ett par celler med bågar, vilket särskilt synes vara fallet i apotheciets centrum, kunde i andra fall spår av bågförbindelser

mellan äldre askogena celler observeras ganska långt (200—300 μ) under det egentliga hymenieskiktet, vilket tyder på en avsevärd utveckling av den andra hyftypen.

Som tidigare påpekats förete de bågformade förbindelserna mellan de askogena hyfcellerna såväl i utvecklingsmekanism som i slutgiltig form stora morfologiska likheter med bågarna i det sekundära mycelet hos flertalet autobasidiomyceter. En eventuell skillnad skulle möjligen vara, att cellväggar ej regelbundet bildas i de bågformade utbuktningarna hos *S. trifoliorum*. Liknande oregelbundenheter ifråga om cellväggarnas utbildning i bågarna förekomma emellertid ej så sällan hos basidiomyceterna (GÄUMANN 1928), varför även denna skenbara olikhet bortfaller. Vi ha alltså i *S. trifoliorum* ett exempel på en askomycet, där en del av den dikaryotiska fasen i morfologiskt avseende fullständigt överensstämmer med motsvarande stadium hos autobasidiomyceterna.

b. *Diskussion angående askomycethakarnas och basidiomycetbågarnas härstamning och funktion.*

Det föreliggande materialet av *Sclerotinia trifoliorum* erbjuder vissa möjligheter till komplettering av några av de moderna teorierna om askomycethakarnas och basidiomycetbågarnas härstamning och funktion. Två olika frågor äro särskilt aktuella. Den första frågan gäller bågarnas eventuella utveckling från askomyceternas hakar. Som bekant blev genom KNIEPS jämförande undersökningar homologien mellan dessa bildningar säkert fastställd. Sedan dess har GREIS genom undersökningar av *Sordaria* och *Tuber* (GREIS 1938) kunnat uppställa en rad utvecklingstyper av aski, som ytterligare styrka denna homologi. I det schema, som GREIS uppställer, jämföres askusutvecklingen hos en del raser av *Sordaria fimicola* och *Tuber æstivum* direkt med basidiebildningen hos flertalet högre autobasidiomyceter. Om man bortser från den utvecklingsskillnad, som betingas av hakarna respektive bågarna, finner man så gott som fullständig morfologisk överensstämmelse i de yngre stadierna av askus och basidie hos dessa typer framför allt därigenom, att aski och basidier bildas ensamma i respektive hyfspetsar. Kärnorna från hake respektive båge invandra i den subterminala cellen, vilken sålunda blir tvåkärnig, och transitorisk askus- respektive basidiebildning utebli. GREIS antager nu en utveckling av basidiomyceternas bågar dels från askomycetformer med icke utväxande hakar (vissa *Sordaria*typer över *Tuber* till högre basidiomyceter) dels från askomycetformer med utväxande hakar, d. v. s. transitorisk askusbildning (*Pyronema*typ till lägre basidiomyceter med transitorisk basidiebildning, t. ex. *Corticium*), alltså en polyfyletisk utvecklingsserie. Hakarnas omvandling till bågar antager GREIS försiggå genom en förskjutning av bildningsorten från hyfcellens spets nedåt förknippad med den dika-

ryotiska fasens förlängning. Enligt min mening ligger det närmare till hands att tolka överensstämmelserna i askus- och basidiebildningen hos ifrågavarande former inom respektive svampgrupper som parallella företeelser inom olika utvecklingsserier å ena sidan hos askomyceterna, *Sordaria* med obetydlig och *Tuber* med mera välutvecklad dikaryotisk fas, och a andra sidan hos de högre autobasidiomyceterna.

Möjligheterna att ur det till buds stående materialet av recenta, noggrant undersökta typer i de båda svampgrupperna få fram verkliga anknytningspunkter äro enligt min uppfattning ganska begränsade. Vissa hållpunkter på de möjliga omständigheter, under vilka basidiomycetbågarna uppkommit i en tänkt, fylogenetisk serie, kunna dock erhållas, om huvudvikten lägges på askomycettyper, som ha speciellt välutvecklad dikaryotisk fas med hakbildning icke blott vid basen av aski utan även mellan underliggande celler i de askogena hyferna och som dessutom genom hakens eller hos *S. trifoliorum* bågens utväxande ha transitorisk askusbildning. Genom ett studium av sådana typer kunna mera fruktbara direkta jämförelser göras, huru kärn- och celldelningsmekanismen möjligen uppkommit i det sekundära bågförsedda mycelet hos lågtstående basidiomyceter med transitorisk basidiebildning, t. ex *Hypholoma fasciculare* och *Corticium varians*, vilka enligt Kniep (1915, 1917) och Greis (1938) utan tvivel representera en primitiv typ hos basidiomyceterna. Det bör dock ännu en gång påpekas, att dessa jämförelser endast avse parallella utvecklingsföreteelser inom respektive grupper och icke en direkt härstamning av den ena typen från den andra. Exempel på askomycetformer, som uppfylla ovanstående krav, äro *Helvella crispa* (Carruthers 1911), *Arachnopeziza aurelia* (Raymond 1934) samt flera lavarter (Moreau 1922, 1925 a, b, 1928). Hos samtliga dessa arter finnas mellan de askogena hyfcellerna bågformade förbindelser som i hög grad påminna om motsvarande bildningar hos basidiomyceterna. Utvecklingen sker emellertid fortfarande genom mer eller mindre typiska askomycethakar, i varje fall hos *Helvella crispa* och *Arachnopeziza aurelia*, där förhållandena äro närmare undersökta. Även hos flertalet undersökta lavar synas celldelningarna i de askogena hyferna föregås av terminal krökning i de översta cellerna liksom regeln är hos icke licheniserade askomyceter (Moreau 1922, 1925 a, 1928). Hos *Parmelia acetabulum* (Moreau 1925 b, fig. e) ha sidoställda utbuktningar på de askogena hyferna kunnat iakttagas, men det framgår icke, om dessa härstamma från spetsen eller sidan av den terminala hyfcellen, och själva mekanismen vid cell- och kärndelningen är ännu ej klarlagd. Det är ej osannolikt, att man inom denna grupp skulle kunna finna arter, vilkas dikaryotiska faser uppvisa övergångstyper mellan normala askomycethakar och normala basidiomycetbågar. Till detta urval av askomyceter (respektive licheniserade askomyceter) kan nu *S. trifoliorum* fogas.

Denna art erbjuder nämligen genom sin askogena hyfutveckling med laterala anläggningar av till formen typiska basidiomycetbågar, ytterligare morfologiska likheter med det sekundära mycelet hos de primitiva basidiomyceterna. Att utan vidare antaga en utveckling av de lägre basidiomyceterna från askomycetformer av samma eller liknande typ som *S. trifoliorum* anser jag emellertid, som tidigare påpekats, vara oriktigt. Dessutom måste man taga hänsyn till den väsentliga skillnad, som ligger i den olika fysiologien hos de båda svampgruppernas dikaryotiska faser. De askogena hyferna äro som bekant till skillnad från det bågförsedda basidiomycetmycelet i regel icke metaboliskt oberoende utan hänvisade till en till den haploida fasen »parasitiskt» bunden tillvaro. Möjligen utgör *Sordaria* ett undantag från denna regel (se nedan). Realiserandet av typiska basidiomycetbågar inom askomyceterna är emellertid intressant ur den synpunkten, att det hos *S. trifoliorum* synbarligen sammanhänger med den dikaryotiska fasens ovanligt rika utveckling.

För att ytterligare belysa förhållandet till basidiomyceterna vore det naturligtvis av ett visst värde att närmare klarlägga huruvida de askogena hyferna hos *S. trifoliorum* äro helt oförmögna till ett oberoende näringsupptagande eller om de under vissa omständigheter kunna föra en självständig tillvaro. Med hänsyn till att olika haploida celler av svampen (sporer, mycelfragment, stycken av sklerotier) med lätthet kunna odlas på såväl naturliga som syntetiska substrat, föreföll det ej uteslutet, att även den dikaryotiska fasen skulle kunna odlas på liknande sätt. Jag utförde därför några försök, varvid de askogena hyferna utpreparerades med mikromanipulator från olika apothecieskaft från biotypen W 6-1 och ympades på den i vanliga fall använda näringsagarn. Sammanlagt 27 askogena hyfer bestående av de 3—5 översta cellerna i varje hyf uttogos, men ingen av dessa vidareutvecklades. 16 partier av vävnaden i det blivande subhymeniet, vart och ett bestående av cirka 50 celler, utpreparerades även, och i 7 av dessa fall utväxte normala vegetativa mycel, vilka senare bildade sklerotier. Samtidigt ympades som kontroller 16 fragment ur den subkortikala vävnaden i ett av de sklerotier, som bildat apothecieskaften på andra plattor med samma substrat och i alla dessa fall vidareutvecklades ympmaterialet till normala mycel.

Liknande negativa resultat vid odlingsförsök med askogena hyfer ha tidigare erhållits med *Pyronema* (Kerl 1937). Trots detta håller jag det för troligt, att ytterligare försök av detta slag med askogena hyfer av *S. trifoliorum* på substrat innehållande näring av liknande eller samma art som i apothecieskaftets haploida hyfer, skulle giva positiva resultat. Ovanstående försök visa emellertid, att de askogena hyferna ej äro förmögna till samma oberoende näringsupptagande som den haploida fasen.

Helt nyligen ha positiva resultat vid regenerationsförsök med askogena

hyfer offentliggjorts (Greis 1941). Vid sina studier av den relativa sexualiteten hos askomyceterna har Greis sålunda lyckats på vanlig näringsagar odla samtliga utvecklingsstadier utom unga aski av *Sordaria fimicola*. Regeneraten av de askogena hyferna ha emellertid icke undersökts cytologiskt. Att döma av Greis' avbildningar torde de utväxande hyferna icke ha bibehållit sin dikaryotiska karaktär utan slagit om till det rent vegetativa stadiet. Greis diskuterar även utförligt och söker under flera motiveringar förklara Kerls ovannämnda negativa odlingsförsök med askogena hyfer av *Pyronema*, vilken svamp ifråga om kärn- och sexualitetsförhållanden är fullt jämförbar med *Sordaria*.

De negativa resultaten med *Pyronema* jämte de föreliggande likartade observationerna hos *Sclerotinia* synas mig i jämförelse med de positiva resultaten hos *Sordaria* åtminstone tillsvidare icke berättiga till något annat antagande än att dikaryofasens regenerationsförmåga är olika hos olika svampsläkten.

Den andra frågan, som i detta sammanhang är värd att diskutera, gäller askomycethakarnas respektive basidiomycetbågarnas funktion. Denna fråga är emellertid så intimt förbunden med den föregående, att man vid behandlingen måste taga hänsyn till båda. Sedan länge har en viss oklarhet rått beträffande hakarnas respektive bågarnas betydelse och godtagbara förklaringar ha tills för kort tid sedan icke funnits. I regel har man betraktat dessa bildningar som kärnfördelningsmekanismer, vilka skulle ha till uppgift att säkra eller åtminstone underlätta den riktiga fördelningen av de sexuellt eller på annat sätt differentierade komponenterna i respektive kärnpar, så att de båda kärnorna, som slutligen sammansmälta i askus respektive basidie, få samma konstitution som det ursprungliga kärnparet. I detta sammanhang synes särskilt termen sexuellt differentierad ha använts utan närmare definition.

Bland de modernare teorierna har utan tvivel den av Martens (1932) framlagda tilldragit sig den största uppmärksamheten. Enligt denna teori har askomycethakarna framtvingats av rymdtekniska skäl. »Sexuell» differentiering i de tvåkärniga hyferna förutsättes (»la cellule binucléée et bisexuée»). I de askogena hyfernas spetsceller ligga i regel de två kärnorna ovanför varandra (»la position superposée des noyaux») och utvecklingen av hakar har därför enligt Martens varit den nödvändiga utvägen att säkra en riktig kärnfördelning vid den fortsatta celldelningen. Denna teori är utan tvivel mycket bestickande, men godtages ej till fullo av Gäumann (1940 p. 449), som påpekar vissa svagheter i densamma. — En annan uppfattning, byggande på en jämförelse mellan hakarnas och game-

tangiernas i vissa fall likartade krökningar har framställts av LOHWAG (1927); denna kritiseras emellertid med skärpa bl. a. av MARTENS och GÄUMANN. — Slutligen har GREIS (1938) uppställt en tredje, i GÄUMANNS översiktsverk (1940) icke behandlad, teori, vilken i det följande närmare kommer att diskuteras, enär det föreliggande materialet av *S. trifoliorum* erbjuder vissa möjligheter härtill.

Med stöd dels av det faktum att hakarna respektive bågarna helt saknas inom stora grupper speciellt hos basidiomyceterna, dels av att oregelbundenheter i deras cytologiska förhållanden så ofta förekomma, att de icke kunna betraktas som undantag, har GREIS bestämt tagit avstånd från den uppfattningen, att hakarna respektive bågarna skulle vara kärnfördelningsmekanismer och i stället utformat en teori om att de i sin ursprungliga form äro förökningsorgan för de sporproducerande elementen, nämligen aski. Bågarna hos de högre basidiomyceterna utan transitorisk basidiebildning skulle vara omändrade askomycethakar, som förlorat sin ursprungliga funktion. Även om man icke kan godtaga samtliga detaljer i den bevisföring, vari GREIS framställer de sannolika orsaker, som varit utslagsgivande vid askomycethakarnas ursprungliga utveckling till förökningsorgan, kvarstår dock det bestämda intrycket, att hans teori i stort sett är hållbar. De invändningar, som kunna göras mot bevisföringen, avse det förhållandet, att GREIS som stöd för sin åsikt framhäver saknaden av hakar hos den primitiva askomycetgruppen *Plectascales*, trots att välutvecklade dylika tidigare påvisats hos representanter för denna grupp, nämligen *Byssochlamys fulva* (EMMONS 1935) och *Arachniotus spec.* (DE LAMATER 1937). Dessa invändningar äro emellertid av oväsentlig karaktär och förändra icke innebörden i den del av GREIS' teori, som avser hakarnas respektive bågarnas funktion.

Ytterligare stöd för denna teori kan hämtas ur det nu föreliggande materialet av *Sclerotinia trifoliorum*. En jämförelse mellan de båda stadierna i de askogena hyfernas utveckling hos denna svamp visar, som tidigare framhållits, en viktig gemensam karaktär nämligen den, att vid kärnparsreproduktionen de nybildade cellerna ständigt få samma komponenter som ingått i det ursprungliga kärnparet. Ett fasthållande vid denna regelbundna kärnfördelning, vars stora betydelse för variationen inom arten senare kommer att diskuteras, måste utan tvivel betraktas som en primär faktor i de askogena hyfernas utformning. En övergång från det tidigare utvecklingsstadiet utan bågformade förbindelser mellan tvåkärnscellerna till det senare med bågar skulle med hänsyn till bibehållandet av den regelbundna kärnfördelningen vara motiverat av följande rymdtekniska förändringar i cellerna, nämligen antingen om cellbredden i den aktiva terminala cellen efter hand minskades, eller om kärnstorleken ökades eller slutligen vid en kombination av bägge dessa förhållanden. Det är emellertid icke möjligt, att i

samband med övergången från det tidigare till det senare utvecklingsstadiet konstatera några mätbara förändringar av ovanstående slag; kärndimensioner och cellbredder voro i själva verket av samma storleksordning i de aktiva övre cellerna hos båda utvecklingstyperna. Övergången till det bågförsedda stadiet förefaller således icke vara betingad av rymdtekniska svårigheter i samband med de simultana delningarna, vilka hade kunnat övervinnas genom den avsevärda lokala ökning i cellbredden, som åstadkommes genom laterala anläggningar av bågar. Det är svårt att i detta fall se något direkt orsakssammanhang mellan uppkomsten av bågar och den simultana kärndelningsmekanismen. En mera tillfredsställande förklaring pa bågarnas funktion kan erhållas, om man tillämpar de synpunkter, som framställas i GREIS' ovan relaterade teori, nämligen att hakar respektive bågar tjänstgöra som förökningsorgan. Det senare stadiet i de askogena hyfernas utveckling hos *S. trifoliorum* (Fig. 23—28) skiljer sig nämligen från det tidigare icke blott genom förekomsten av bågar utan även genom dessas medverkan dels vid uppkomsten av förgreningar, dels vid den transitoriska askusbildningen. Bägge dessa företeelser bidraga i det första fallet indirekt, i det andra direkt till en ökning av de sporproducerande elementen, aski. Bågarnas roll vid utbildningen av förgreningar i de askogena hyferna har såsom här nybeskriven företeelse givetvis icke kunnat ingå i GREIS' teori, vilken beträffande askomyceterna uteslutande rör sig om den transitoriska askusbildningen. Denna utökade och med föregående samordnade funktion hos bågarna måste utan tvivel betraktas som ett ytterligare stöd för GREIS' förökningsteori. Att förgreningar icke bildas i de askogena hyfernas tidigare utvecklingsstadium (Fig. 17 22) kan sannolikt tillskrivas bristen på lämpliga vegetationspunkter i de subterminala cellerna. I och med uppkomsten av bågar, som innehålla aktiv, meristematisk plasma och kompletterande cellkärna, erbjudas åt de subterminala cellerna potentiella vegetationspunkter, vilka i flera fall synbarligen utnyttjas vid utbildningen av förgreningar.

c. *Förhållandet mellan haploid och dikaryotisk vävnad inom apotheciet.*

Hos *S. trifoliorum* anläggas de askogoniala cellerna successivt mot slutet av apothecieskaftens utveckling. Tidpunkten för begynnelsen av denna process bestämmes uppenbarligen av de vid groningen rådande ljusförhållandena. I etiolerade skaft, vare sig de utvecklats i fullständigt mörker eller i stark skugga, iakttogos inga askogoniala celler eller askogena hyfer. Vid indirekt ljus i något större kvantiteter observerades i en del 5 10 mm. långa skaft ej heller några spår av dessa organ, under det att andra likstora eller obetydligt äldre stadier uppvisade riklig förekomst av bägge celltyperna. I material, som under kortare perioder utsatts för direkt sol-

ljus, kunde även i mycket korta skaft — ½ till 1 mm. — i vissa fall tvåkärniga askogena hyfer påvisas, vilket tyder på, att de askogoniala cellerna i dessa fall anlagts ännu tidigare, möjligen redan i primordierna i sklerotiernas subkortikala vävnad. Att döma av observationer av den askogena hyfutvecklingen från senare anlagda askogoniala celler måste man nämligen räkna med att denna sker något långsammare än tillväxten hos de omgivande vegetativa hyferna. Några tillfredsställande kärnbilder från cellerna i primordierna kunde som tidigare påpekats på grund av färgningssvårigheter icke erhållas, varför en viss oklarhet råder angående den exakta tidpunkten för anläggningen av de första askogoniala cellerna i dessa solbelysta skaft.

Den föregående beskrivningen av den askogena hyfutvecklingen har grundat sig på observationer från medellånga i indirekt ljus utvecklade skaft, hos vilka längdtillväxten nätt och jämnt hunnit avstanna. Av jämförelser mellan olika, ungefär likgamla stadier framgick, att regionen med mera långsamväxande askogen vävnad i dessa skaft med avslutad längdtillväxt i regel anlagts vid en något kortare skaftlängd och i samband med den sista sträckningen förskjutits en—ett par mm. uppåt. Utvecklingen av dikaryofasen började sålunda i dessa fall i stort sett samtidigt med avstannandet av apothecieskaftens sträckning.

Av ovanstående iakttagelser framgår, att utvecklingen av fruktkroppens haploida vävnader och utvecklingen av dikaryofasen hos *S. trifoliorum* äro två till tiden i regel skilda processer. Med stöd härav samt de i föregående kapitel framlagda observationerna angående ljusets formbildande inflytande (sid. 15) kan det vidare konstateras, att utvecklingen av de haploida vävnaderna kan ske utan närvaro av ljus, under det att utvecklingen av dikaryofasen fordrar en viss ljusmängd. Med stigande ljusmängder förkortas den haploida fasen i fruktkropparna för att vid ett visst värde fullständigt hämmas. Dikaryofasens utveckling däremot ökar med stigande ljusmängder och visar även vid gränsvärdet för apothecieskaftbildningen ingen tendens till minskning. Närvaron av askogena hyfer även i mycket korta solbelysta skaft visar, att de båda utvecklingsprocesserna under vissa ljusförhållanden (i närheten av ovannämnda gränsvärde) kunna försiggå i stort sett samtidigt.

I naturen torde det av ljuset betingade fullständiga undertryckandet av utvecklingen av fruktkroppens haploida vävnad mera sällan förekomma, enär sklerotierna i allmänhet ligga ett stycke under markytan, där de under lämpliga temperatur-, fuktighets- och syrebetingelser gro oberoende av ljuset.

Det är mycket troligt, att det verkliga underlaget till igångsättandet av haplofasens utveckling från sklerotiet och dikaryofasens inom fruktkroppen består i en bildning av specifika tillväxtämnen, av vilka det för den

förra nödvändiga bildas vid frånvaro av ljus, det för den senare vid närvaro av ljus. Utforskandet av den eventuella förekomsten av dylika ämnen och deras natur ligger emellertid utanför ramen av det föreliggande arbetet.

3. Kärnförhållanden i askus.

Föregående undersökningar. Hos *S. trifoliorum* inga. Hos andra askomyceter åtskilliga (litteratur: RAYMOND 1934, GWYNNE-VAUGHAN and BARNES 1937).

Egna undersökningar. I den tvåkärniga terminala askogena hyfcell, som sedermera utväxer till askus, inträffa före karyogamin följande förändringar i kärnornas storlek och struktur. Kärnvolymen blir åtskilliga gånger större än i föregående stadium, membranen mellan karyolymfa och cytoplasma blir mera markerad, och vidare uppträda kromatiska trådar i kärnan (Fig. 32). De senare stå i förbindelse med och syntes åtminstone delvis härstamma från den kromatiska centralkroppen, som under den pågående differentieringen av kärnorna icke mätbart förändras i volym men väl i färgbarhet. Den svaga rosafärgning med FEULGEN, som i föregående stadium varit utmärkande för denna kropp, avtager nämligen märkbart under detta stadium och är vid den följande kärnsammansmältningen och även i senare stadier av askusutvecklingen helt försvunnen. De kromatiska trådarna, som i samband med denna minskade färgbarhet hos centralkropparna bliva synliga i karyolymfan, äro däremot, förutom med hämatoxylin och gentianaviolett, färgbara med FEULGEN, varvid de antaga en mörkröd färgton. Detta skulle tyda på en extraktion av kromatiskt nucleoprotein från centralkroppen, vilken sålunda härigenom syntes differentieras i normal nukleol (färgbar med hämatoxylin och gentianaviolett, icke färgbar med FEULGEN) och ett thymonukleinsyrehaltigt trådsystem, karyotinet. Som tidigare påpekats (sid. 30) är emellertid den kromatiska centralkroppen



Fig. 32—37. Kärnsammansmältningen i askus — Hämatoxylin — x 2700.

Kernverschmelzung im Askus. — Hämatoxylin — x 2700.

sannolikt en av fixeringen framkallad konstprodukt, varför det i levande material följaktligen ej kan vara fråga om en dylik extraktion. Det verkliga förhållandet är snarare, att det redan tidigare förefintliga känsliga, i kärnrummet utbredda karyotinnätet nu antagit en stabilare struktur.

Kärnsammansmältningen äger rum efter en kortare längd- och breddtillväxt hos den tvåkärniga cellen, då denna nått en storlek av ungefär 3.5×15 μ. De båda kärnorna ligga i detta moment i regel ovanför varandra; kontakten och den följande upplösningen av de mot varandra gränsande partierna av kärnmembranerna sker oberoende av nukleolernas läge i kärnorna (Fig. 33, 34). Kort efter karyogamin sammansmälta även nukleolerna (Fig. 35, 36). Det kromatiska trådsystemet synes vid kärnsammansmältningen och i zygotkärnan under en kortare period i början av askusens fortsatta tillväxt som ett mer eller mindre utpräglat i karyolymfan utbrett reticulum, tydande på att kärnan befinner sig i metaboliskt stadium (SHARP 1934, WILSON 1937). Zygotkärnan har till en början formen av en långsträckt ellipsoid; dess volym ökas avsevärt under askusens tillväxt, och i samband härmed sker också en viss avrundning av kärnan, som dock under hela den följande profasen förblir mer eller mindre långsträckt.

Tolkningen av de olika stadierna i den följande meiotiska profasen försvårades genom den regelbundna förekomsten av extranukleära kroppar i den del av cytoplasman, som gränsar omedelbart intill själva kärnan. Dessa kroppars utseende och uppträdande kommer längre fram att närmare beskrivas. De färgas vid de här använda fixeringsmetoderna med hämatoxylin och gentianaviolett ungefär lika starkt som karyotinet, men avfärgas vid differentiering i järnalun och nejlikolja långsammare än det sistnämnda, vilket försvårar erhållandet av entydiga preparat. Genom parallellfärgning av snitt från samma apothecium med hämatoxylin, gentianaviolett och FEULGEN, kunde emellertid vissa drag i profasen iakttagas. Flera av de stadier, som äro utmärkande för en normal meiosis återfunnos sålunda. Den obetydliga karyotinmängden och kärnornas ringa storlek omöjliggöra dock studiet av morfologiska kromosomdetaljer.

De första tecknen på begynnande profas visa sig i zygotkärnan kort efter dennas uppkomst vid en askuslängd av 30—40 μ. I det mer eller mindre utpräglade karyotinnätverket är det nu möjligt att urskilja en begynnande individualisering till långa kromatiska trådar. Det är påfallande, att dessa redan från början synas vara partiellt parade (amfitänt tillstånd, Fig. 38). Något tydligt stadium med enskilda kromatiska trådar (leptotän) kunde alltså icke iakttagas, varför man tvingas antaga, att ett dylikt stadium antingen är av mycket kortvarig art, eller att det ej kunde särskiljas från zygotkärnans karyotinnätverk omedelbart innan de första iakttagbara profastecknen framträda. I fortsättningen observerades en fortskridande par-



Fig. 38—42. Profasen till 1. kärndelningen i askus — 38-41 Hämatoxylin; 42 Feulgen's nuklealreaktion — x 2700.

Prophase zur ersten Kernteilung im Askus. — 38, 41 Hämatoxylin: 42 Feulgen's Nuclealreaktion — x 2700.

ning mellan trådarna, vilken inom kort blev fullständig (zygotän, Fig. 39), varefter den efterföljdes av kontraktion (pachytän, Fig. 40). Under dessa tidiga profasstadier, som iakttogos medan askusen ännu var ganska kort (intill en askuslängd motsvarande ¼—⅓ av den definitiva), voro hela tiden en eller ett par av de kromatiska trådarna i kontakt med nukleolen.

Under pachytän förlorar karyotinet fullständigt sin basikromatiska karaktär, och inom kärnan färgas med hämatoxylin och gentianaviolett endast nukleolen. Även Feulgen's nuklealreaktion gav helt negativa resultat, trots att åtskilliga olika fixeringsmedel prövades. De förut kromatiska trådarna kunde dock svagt skönjas i en del preparat, troligen på grund av deras från karyolymfan något avvikande ljusbrytningsförmåga. Det var svårt att få en säker uppfattning om den exakta tidpunkten för detta diffusa skedes början. Härtill bidrog bl. a. den omständigheten, att askusutvecklingen inom ett och samma apothecium hos denna art, liksom fallet är hos åtskilliga andra diskomyceter, sker med en viss rytm så till vida, att ett stort antal aski samtidigt genomgå ungefär samma utvecklingsstadium. Endast några få dylika, visserligen av många individer bestående, men till utvecklingsgraden väl skilda »generationer» av aski kunna observeras samtidigt inom en fruktkropp. Det förefaller emellertid av jämförelser mellan olika apothecier att döma, som om den minskade mottagligheten för basiska färgämnen hos karyotinet börjar förhållandevis snabbt, då askusen uppnått omkring en tredjedel av sin slutgiltiga längd. Detta diffusa stadium bibehålles därefter under större delen av askusens tillväxt. Vid långvarig inverkan av sura färgämnen (lichtgrün, erythrosin) erhölls på detta stadium en diffus färgning av hela karyolymfan, som starkt kontrasterade dels mot den svagare färgade omgivande cytoplasman, dels och i särskilt hög grad mot den helt akromatiska karyolymfan i yngre zygotkärnor. Innebörden av detta diffusa stadium kommer senare att diskuteras (sid. 124).

Sedan askusen tillväxt till sin i det närmaste slutgiltiga längd, återfår karyotinet successivt sin basikromatiska karaktär. Under denna övergång kunde de morfologiska strukturerna i kärnans inre endast otydligt urskiljas. Av vissa preparat framgick emellertid, att karyotinet, när det åter blivit skönjbart, är organiserat på liknande sätt som vid det diffusa stadiets början, nämligen i förhållandevis grova bivalenta trådar (pachytän). Under den gradvis tilltagande färgbarheten bliva dessa mera oregelbundna i konturerna och en oskarp partiell upplösning av den förut intima kontakten inom dubbeltrådarna gör sig gällande. Vid återvunnen full färgbarhet hade trådarna kontraherats till tjocka, i regel kort stavformade bivalenter. Detta stadium torde närmast motsvara sen diakines i fanerogammeiosen. Bivalenternas konturer äro till en början ej skarpa, utan smala stråk av svagare basikromatiskt material utstråla från kortändarna (Fig. 41). I allmänhet ligga bivalenterna m. e. m. hopklumpade inne i kärnan (inverkan av fixeringen?), men i några preparat var fördelningen mera spridd och antalet kunde uppskattas till 5 à 6 (Fig. 41, 42). Det sistnämnda talet är troligen det riktiga, då det haploida kromosomtalet visade sig vara 6.

Efter ytterligare kontraktion samlas bivalenterna i en tämligen kompakt grupp i centrum av kärnan ungefär i det blivande ekvatorialplanets mitt. I kärnperiferien eller omedelbart utanför denna uppträder samtidigt en punktformig centrosom, från vilken förbindelse med kromosomgruppen etableras medelst svagt basikromatiska, anmärkningsvärt raka plasmastråk (Fig. 43). Kärnmembranen börjar på detta stadium att upplösas, varför centrosomens härstamning icke med säkerhet har kunnat fastställas. Det mest sannolika är dock, att den i likhet med förhållandet hos andra askomyceter är av intranukleärt ursprung. Genom delning uppkomma två dottercentrosomer, vilka vandra utmed kärnperiferien cirka ett kvarts varv åt motsatta håll (Fig. 44, 45) och utveckla den definitiva kärnspolen på liknande sätt, som tidigare beskrivits hos några andra askomyceter (se RAYMOND 1934, och där citerad litteratur).

Det är anmärkningsvärt, att kärnspolen i samtliga observerade fall av denna delning (cirka 60) var m. e. m. transversalt orienterad, trots att askusen under detta stadium är relativt smal (5.5–6 μ). I den cytologiska askomycetlitteraturen angives i allmänhet spolen vid zygotkärnans 1. delning vara longitudinell, vilket också av rymdtekniska skäl är att förvänta. I undantagsfall förekomma dock hos några av dessa arter enstaka aski med transversala spolar i 1. kärndelningen, t. ex. *Pyronema confluens* (HARPER 1900, CLAUSSEN 1912) och *Ascobolus magnificus* (DODGE 1920). Hos *Ascobolus winteri* är däremot en transversal orientering det normala förhållandet (DODGE 1927).

Vid anafasen kunde sex punktformade kromosomer ses passera till varje

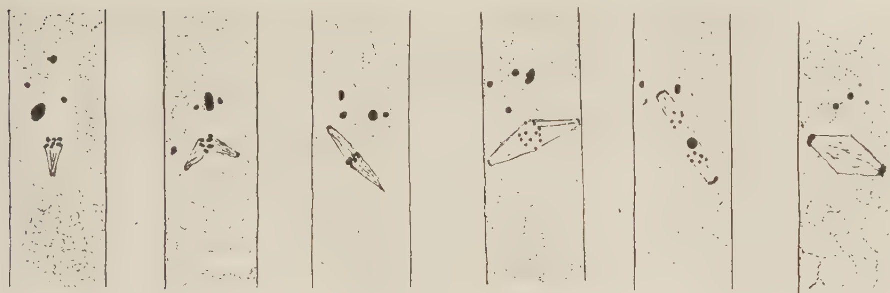


Fig. 43—48. 1. kärndelningen i askus. 43—45 Metafas. 46, 47 Anafas. 48 Telofas. Gentianaviolett — x 2700.

1. Kernteilung im Askus. 43—45 Metaphase. 46, 47 Anaphase. 48 Telophase. Gentianaviolett — x 2700.

pol (Fig. 46, 47), där de samlades i kompakta grupper (Fig. 48). Kring dessa utbildas de till en början mycket små dotterkärnorna, vilka efter en kortare eller längre förflyttning mot askusens bas respektive spets, under avsevärd tillväxt organiseras med nukleol och ett nätverk av karyotin. Avståndet mellan de rakt eller snett ovanför varandra liggande dotterkärnorna varierar mellan en halv och tre kärndiametrar. Nukleolen, som under första delningens profas bibehållit sin sfäriska form och starkt basikromatiska karaktär antar under metafasen en ojämnare form och förlorar delvis sin färgbarhet. Vid slutet av första delningen sönderfaller den i några smärre oregelbundna kroppar, vilka utstötas i cytoplasman.

Andra delningen inledes med uppträdandet av cirka 6 punkt- eller kort stavformade kromosomer i anslutning till de övervägande longitudinellt orienterade kärnspolarna (Fig. 50). I anafasen observerades ungefär 12 kromosomer i hela kärnan, men i likhet med förhållandena vid 1. delningen var det icke möjligt att närmare iakttaga mekanismen vid själva kromosomdelningen.

De genom 2. delningen bildade fyra kärnorna äro efter tillväxt organiserade på samma sätt som i tvåkärnstadiet nämligen med nukleol och karyotinnät (Fig. 51). I 3. delningen iakttogos i tidigare stadier cirka 6 (Fig. 52) och i senare cirka 12 (Fig. 53) kromosomer i varje kärna. I figur 53, som återgiver 3. delningens anafas, bilda samtliga kärnspolar vinklar med det optiska planet, varför de i figuren se kortare ut än de äro i verkligheten. Kärnspolarnas orientering är helt oregelbunden; olika vinklar bildas i regel såväl inbördes som med askusens längdaxel.

Vid såväl 2. som 3. delningen inträffar det ej sällan, att två parallella men ej fullt longitudinella kärnspolar ligga mycket nära varandra. Grup-

perna av telofaskromosomer få då ofta en sådan inbördes placering (Fig. 60), att det vid den efterföljande kärndifferentieringen kan inträffa att systerkärnor bliva skilda åt av icke-systerkärnor (Fig. 61). Detta senare förhållande vill jag särskilt framhålla, emedan det är av betydelse vid en kommande diskussion angående orsakerna till vissa oregelbundenheter vid sporbildningen (sid. 123).

Den ovanstående tolkningen av kärnförhållandena i askus är icke så enkel, som de återgivna figurerna möjligen låter påskina. Bestämningen av det haploida kromosomtalet erbjuder särskilt stora svårigheter. Åtminstone en tydlig bild av 1. anafasen (Fig. 46) visar emellertid säkert, att sex kromosomer vandra till varje pol. Även i några Feulgen-färgade preparat kunde kromosomer i 1. och 3. delningarna iakttagas, och, ehuru dessa ej voro fullt distinkta, framgick det dock, att det haploida talet låg omkring sex. En bidragande orsak till att icke flera säkra observationer kunde göras var, att kärndelningsstadier voro ganska sällsynta i de fixerade preparaten, varför ett omfattande material legat till grund för iakttagelserna. Den i förhållande till övriga stadier ringa frekvensen kärndelningar tyder på, att dessa åtminstone beträffande meta- och anafasen försiggå förhållandevis snabbt. Fixeringarna utfördes vid olika tider på dygnet och så snabbt som möjligt med omedelbart följande luftförtunning, och det allmänna intrycket från jämförelser mellan olika medel var, att några väsentliga av fixeringen framkallade störningar i kärnornas struktur icke inträffade, i varje fall icke av den art, att pågående delningar exempelvis återgingo i profas eller kollaberade på annat sätt.

På grund av den förut omtalade periodiciteten i askusutvecklingen inom samma apothecium, skulle man vänta sig att åtminstone i några av de cirka 200 undersökta apothecierna finna ett mycket stort antal meta- och anafasstadier samtidigt, om dessa stadier hade haft en sammanlagd varaktighet av omkring en halv timme eller mera. Denna siffra har jag icke kunnat fastställa genom exakta försök utan endast approximativt beräknat såsom en möjlig maximitid med ledning av andra iakttagelser såsom apothecieskålens utbredning jämte den tid som åtgick för vissa störningars cytologiskt iakttagbara framträdande (sid. 120). Det är visserligen sant, att kärndelningsfigurer, när de förekomma i en fruktkropp, icke uppträda ensamma utan alltid några stycken men sällan mer än några tiotal samtidigt. I större apothecier, där ett par tusen aski befinna sig i ett utvecklingsstadium sträckande sig från sen 1. profas till och med åttakärnstadiet innan sporerna differentierats (Fig. 54), kan den låga frekvensen av kärndelningsfigurer icke tillfredsställande förklaras på annat sätt än att delningarnas meta- och anafasstadier ske snabbt (uppskattningsvis på ett par minuter eller ännu kortare tid).

Någon dygnsvariation i kärndelningsfrekvensen synes ej förekomma i

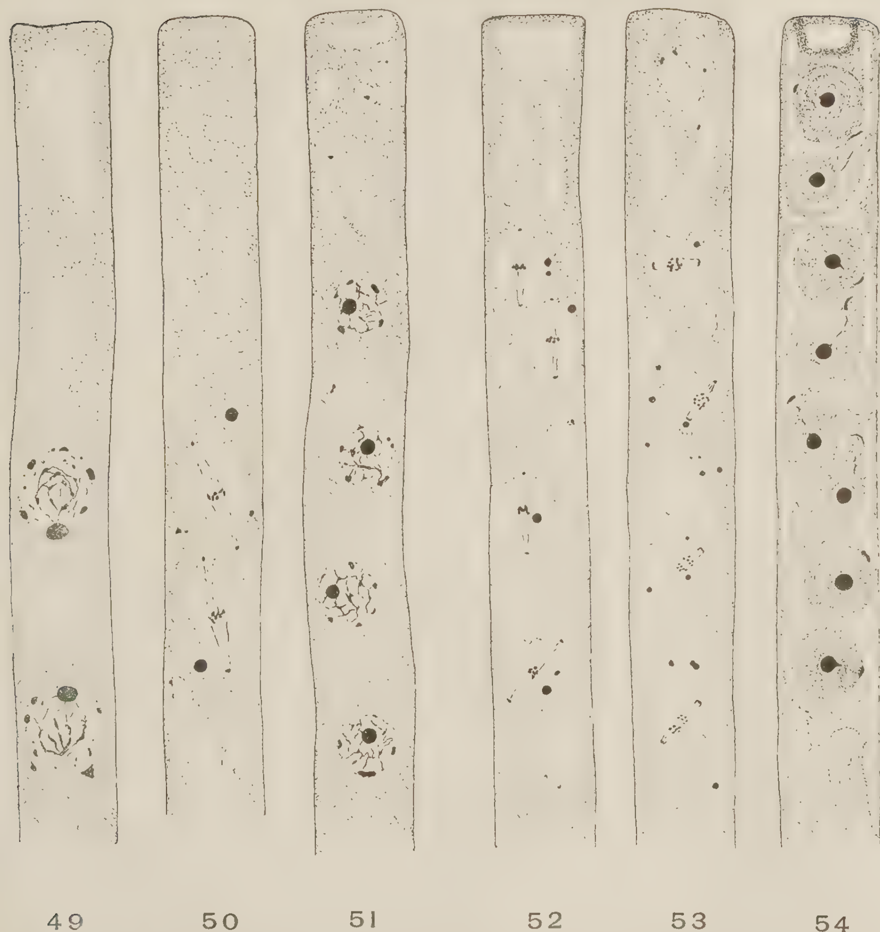


Fig. 49—54. 2. och 3. kärndelningarna i askus: Kärnspolarna i Fig. 53 bilda vinklar med optiska planet. — Hämatoxylin — x 2700.

Die 2. und 3. Kernteilungen im Askus: Die Kernspindeln in Fig. 53 bilden Winkel mit der optischen Ebene. — Hämatoxylin — x 2700.

det undersökta *Sclerotinia*materialet. I olika apothecier, som fixerats var 4. timme dygnet runt, iakttogos inga signifikativa skillnader i antalet kärndelningar, som vid de olika tiderna höll sig på den normala, låga frekvensen. Det bör dock påpekas, att det fixerade materialet i denna undersökning härstammade från sklerotiegroningsprov, som stått i diffust dagsljus vid tämligen konstant temperatur (rumstemperatur). Enligt HEUBERGER (1934) förekommer ej heller hos *Sclerotinia fructicola* (Wint.) Rehm någon dygnsperiodicitet i detta avseende.

Anmärkningsvärt är, att kärndelningsfigurer från 3. delningen i fixerade preparat äro fyra à fem gånger så vanliga som de från 1. och 2., vilket tyder på att den 3. delningen i något bestämt avseende skiljer sig från de båda första. Ehuru detta icke i och för sig visar, att denna delning är av principiellt annat slag än 1. och 2. kan det dock framdragas som ett visst stöd för den gängse, ehuru icke slutgiltigt bevisade uppfattningen (Gäumann 1928), att den 3. delningen i askus är en vanlig mitos till skillnad från de båda första, vilka tillsammans bilda meiosen.

4. Askosporbildning.

Föregående undersökningar. Gilbert och Bennet (1917) iakttogo 1-, 2- och 4-kärniga sporer, Nicolaisen et al. (1940) endast 1- och 2-kärniga.

Egna undersökningar. Omkring de från tredje kärndelningen i askus resulterande grupperna av telofaskromosomer utbildas de åtta sporkärnorna. Dessa bestå i yngre stadier av en sfärisk, kromatisk centralkropp med ljus omgivande gård. I kärnperiferien befinner sig en till en början punktformig, centrosomliknande bildning, vilken medelst ett stavformigt, starkt kromatiskt plasmastråk står i förbindelse med kärnans centralkropp. Det är sannolikt, ehuru det icke med full säkerhet kunde observeras i preparaten, att den centrosomliknande bildningen var identisk med den centrosom, till vilken respektive kromosomgrupper i 3. delningen vandrat. I samband med den följande differentieringen av sporerna blir denna bildning, vilken i det följande betecknas som centrosom, alltmera diskusformad och vandrar centrifugalt från kärnmembranen ut i sporplasman. Förbindelsen med centralkroppen blir härvid avbruten, men kromatiska rester äro synliga någon tid såväl intra- som extranukleärt (Fig. 54).

Det var ej möjligt, att få en fullt klar uppfattning om den mekanism, som reglerade själva avgränsningen av sporernas konturer. Sålunda kunde inga från centrosomerna utgående amfiastrala apparater iakttagas. Centrosomernas läge i de tillväxande sporernas periferi och deras formanpassning efter dessas konturer tyder emellertid på ett aktivt ingripande av centrosomerna i spordifferentieringen av sådan art, som står i överensstämmelse med tidigare gjorda rön (Harper, Gwynne-Vaughan). Det finns sålunda intet skäl att antaga, att sporbildningen hos *S. trifoliorum* i något väsentligt avseende skiljer sig från det av Harper (1905) beskrivna klassiska exemplet *Erysiphe cichoracearum*.

Under den fortsatta spormognaden differentieras kärnan i nukleol med omgivande karyotinnät. Omedelbart utanför kärnperiferien förekomma extranukleära kroppar med samma färgbarhet som i tidigare askusstadier (Fig. 55). Sedan den definitiva, ovala sporkonturen utbildats, försiggår en mitotisk kärndelning med intranukleära spolar och cirka 6 kromosomer

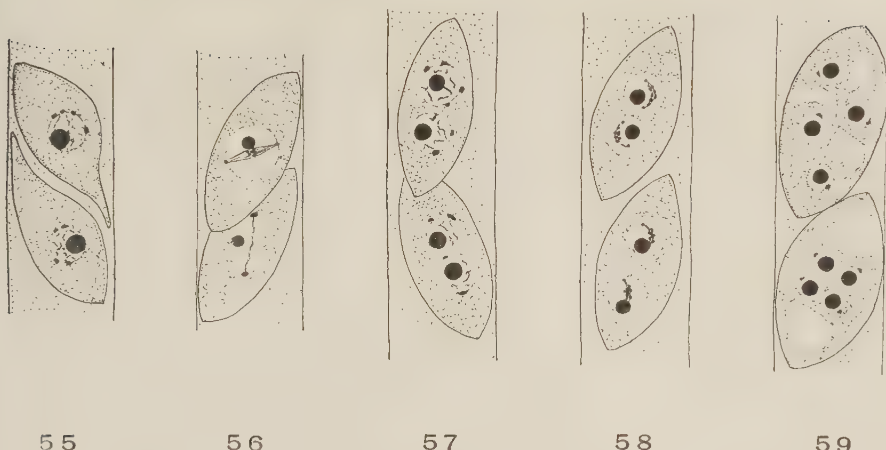


Fig. 55—59. Askosporutvecklingen. — Hämatoxylin — x 2700.

Die Askussporenentwicklung — Hämatoxylin — x 2700.

(Fig. 56). Dotterkärnorna organiseras på samma sätt som de primära sporkärnorna (Fig. 57) och sedan sporerna tilltagit ytterligare något i volym, sker en andra mitotisk delning av liknande typ och med till synes samma kromosomtal som i den första. De fyra härifrån stammande kärnorna avvika emellertid i strukturellt avseende väsentligt från de primära och sekundära. De äro betydligt mindre och bestå även i sin definitiva utformning endast av en kromatisk centralkropp med omgivande karyolymfa. I väl färgade preparat kunde en enda oansenlig extranukleär kropp iakttagas (Fig. 59). Den kromatiska centralkroppen färgades rosa med FEULGEN. Dessa kärnors likhet med de askogena hyfkärnorna har redan tidigare påpekats (sid. 30) och i samband härmed gjordes också det antagandet, att de kromatiska centralkropparna äro av fixeringen framkallade konstprodukter. Den relativt stora stabilitet hos karyotinnätet, som är utmärkande för zygotkärnan och dess avkomlingar t. o. m. de sekundära sporkärnorna har alltså enligt detta antagande försvunnit hos de tertiära sporkärnorna. Från dessa senare härstamma de vegetativa hyfkärnorna, vilka i regel äro organiserade på samma sätt (Fig. 117, sid. 72).

I mycket sällsynta fall (2 på flera tusen iakttagelser) förekom i askus sporer med åtta kärnor. I det ena av dessa fall voro endast fyra av sporerna åttakärniga, de övriga fyra normalt fyrkärniga; i det andra fallet voro samtliga åttakärniga. I det sista skedet av spormognaden förändras ämnesomsättningen i sporplasman så, att hela cellinnehållet mörkfärgas av de använda basiska färgämnena, varefter inga inre detaljer kunna observeras.

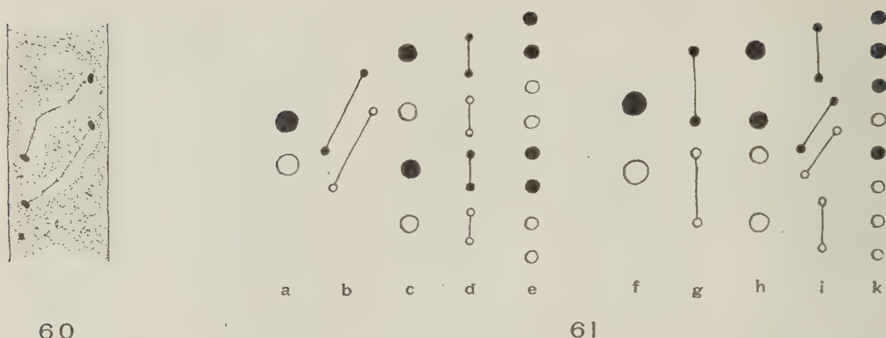


Fig. 60, 61. Platsbyte mellan syster och icke-systerkärnor genom interferens mellan kärnspolarna under 2. och 3. delningen i askus. 60 Två telofasfigurer från 3. delningen. — Hämatoxylin — x 2700. 61 Schematisk framställning av förloppet; a—e interferens vid 2. f—k en av möjligheterna av interferens vid 3. delningen.

Platzwechsel zwischen Schwester- und Nicht-Schwesterkernen durch Interferenz zwischen den Kernspindeln während der 2. und 3. Teilung im Askus. 60 Zwei Telophasefiguren von der 3. Teilung. — Hämatoxylin — x 2700. 61 Schematische Darstellung des Verlaufs: a—e Interferenz bei der 2. f—k eine der Möglichkeiten von Interferenz bei der 3. Teilung.

5. Kondriosomer.

Föregående undersökningar. Hos *S. trifoliorum* inga. Hos andra askomyceter se nedan.

Egna undersökningar. Försök med vitalfärgning av det kondriosomala materialet i olika celltyper av *S. trifoliorum* med utspädda lösningar av Janusgrönt gåvo icke tillfredsställande resultat. Det förefaller som om hyfmembranerna i oskadat tillstånd äro impermeabla för detta färgämne. Sårade membraner å andra sidan genomsläppa färgen så snabbt, att hela cellinnehållet överfärgas även i mycket utspädda lösningar. Goda resultat erhöllos däremot med såväl Benda- som Regaud-fixerat material, färgat enligt respektive metoder.

I de askogena hyferna (Fig. 62) och i yngre aski (Fig. 63, 64) växla kondriosomernas form mellan tämligen korta m. e. m. vridna trådar ofta med några kulformade ansvällningar och helt slutna ringar likaledes med enstaka förtjockningar. Fördelningen inom cellerna är i de askogena hyferna i många fall utpräglat bipolär; i yngre aski förefaller hela cytoplasmarummet vara uppfyllt av kondriosomer dock med en antydan om tätare anhopning i den apikala delen (Fig. 63, 64). I äldre enkärniga aski ha kondriosomerna formen av längre och smalare trådar; de tidigare ansvällningarna äro m. e. m. försvunna. En viss tendens till gruppering kring kärnan kunde iakttagas (Fig. 65) men i övrigt är fördelningen inom cellen betydligt glesare än i yngre stadier. Någon väsentlig förändring av den absoluta mängden kondriosomalt material under askusens tillväxt observerades



Fig. 62—67. Kondriosomer hos *S. trifoliorum*. 62 Askogena hyfceller. 63, 64 Yngre aski. 65, 66 Äldre aski. 67 Sporer — Regaud F — x 2700.

Chondriosomen bei *S. trifoliorum*. 62 Ascogene Hyphenzellen. 63, 64 Jüngere Aski. 65, 66 Ältere Aski. 67 Sporen — Regaud F—x 2700.

icke. I äldre fullvuxna aski är kondriosommängden däremot betydligt mindre, vilket står i överensstämmelse med tidigare observationer på annat askomycetmaterial (Raymond 1934). Under de följande kärndelningarna äro kondriosomerna i stort sett grupperade utefter askusväggen (Fig. 66) men samlas vid spordifferentieringen m. e. m. likformigt kring de åtta sporkärnorna. I de 1- och 2-kärniga sporerna kan man se kortare trådar eller kedjor av liknande utseende som i de askogena hyferna (Fig. 67). Det är således tydligt, att en viss kontinuitet i kondriosomfördelningen förefinnes, i det att varje ny sporgeneration startar sin mycelväxt med en uppsättning, som motsvarar ungefär en åttondel av det i askusen befintliga materialet av detta slag.

Dessa resultat överensstämma i väsentliga delar med vad som framlagts i tidigare undersökningar rörande kondriosomer hos askomyceterna (Guillermond 1913 a, b, Dangeard 1919, Raymond 1934). Ingen av de i den föreliggande undersökningen gjorda observationerna lämnar något stöd till de talrika teorier (sammanställda av Sharp 1934), som framlagts angående kondriosomernas funktion, vilken alltjämt måste betraktas som outredd.

6. Extranukleära kroppar.

Föregående undersökningar. Hos *S. trifoliorum* inga. Hos andra askomyceter enstaka, vilka komma att diskuteras på sid. 125.

Egna undersökningar. I askogena hyfer, aski och sporer förekomma i cytoplasman extranukleära kroppar, som ha en del gemensamma egenskaper, nämligen färgbarhet och en viss regelbundenhet i form och uppträdande. Det har ej lyckats mig att få en klar uppfattning om samtliga dessa kroppar äro självständigt reproducerbara cellelement med bestämda uppgifter eller om en del av dem äro funktionslösa utsöndringsprodukter från kärnan, varför jag endast med tvekan vågar upptaga dem till behandling. Deras uppträdande är trots påtagliga brister i synlig kontinuitet dock så iögonfallande, att de ej kunna förbigås med tystnad. Med extranukleära kroppar avser jag i det följande de hos *S. trifoliorum* och några närstående arter (*S. sclerotiorum* och *S. borealis*) till form och antal för olika utvecklingsstadier tämligen konstanta, i närheten av cellkärnan uppträdande kroppar, som vid fixering med osmiumsyrehaltiga medel eller BOUIN's fixeringsvätska äga samma färgbarhet som nukleolen. De färgas alltså ej med FEULGEN's nuklealreaktion och synas genom sina allmänna egenskaper vara skilda såväl från helt tillfälliga ergastiska substanser som från kondriosomerna.

I de askogena hyfernas terminala celler förekommer åtminstone periodvis i cytoplasman strax utanför var och en av de båda kärnorna en liten sfärisk extranukleär kropp (Fig. 68). Som tidigare påpekats (sid. 32) förefaller det möjligt, att dessa kroppar på något sätt äro engagerade i de simultana kärnparsdelningarna. — I den unga askusen förekomma innan karyogamien normalt två (Fig. 70), mera sällan två större och två mindre sfäriska kompakta kroppar av detta slag (Fig. 71). I kärnsammansmältningsmomentet är deras placering i regel omedelbart intill membranen vid sidan av kontaktytan mellan de båda kärnorna (Fig. 70). Från och med zygotkärnans tillväxt är de extranukleära kropparnas beteende mera oregelbundet och svårtolkat. I vissa fall förefaller det som om de två eller fyra kropparna utanför kärnmembranen verkligen sammansmälte, varefter produkten sprängdes i ett mindre antal olikstora m. e. m. sfäriska kroppar, av vilka flertalet under askusens första tillväxt grupperades på något avstånd från kärnan. Förhållandena under detta utvecklingsskede voro oklara och det är möjligt att en del av de i figur 72 och 73 avbildade kropparna uppkommit de novo. Någon tydlig utstötning av kromatiskt material från kärnans inre kunde jag emellertid icke iakttaga varken nu eller senare. Den fortsatta askustillväxten från 15 à 20 μ till 50 à 60 μ visade bilder av en tilltagande tätare gruppering kring kärnan, men huruvida det var samma kroppar, som kvarstodo från yngre stadier, eller om vissa försvunno och andra nybildades kunde icke avgöras. Samtidigt inträffade också en viss differentiering av de tidiga m. e. m. sfäriska kropparna. Vid en askuslängd av 50—60 μ förekomma sålunda ganska varierande utseenden: korta stavar, enkla eller sammansatta sfäriska kroppar, vanligen med svagare färg-

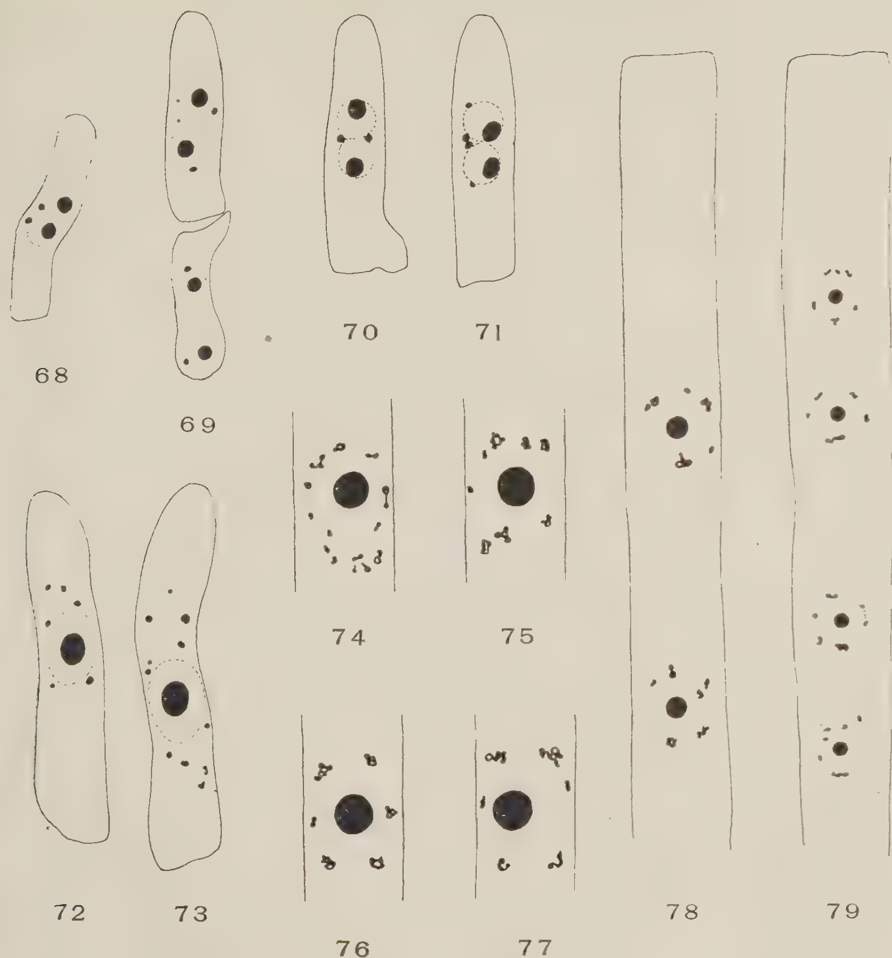


Fig. 68—79. Extranukleära kroppar hos *S. trifoliorum*. 68, 69 Askogena hyfceller. 70, 71 Vid karyogamien i den unga askusen. 72, 73 Korta enkärniga aski. 74, 75 Medellånga enkärniga aski. 76, 77 Enkärniga aski av definitiv längd. 78, 79 Två- och fyrkärniga aski. — Gentianaviolett med förlängd inverkan av nejlikolja. — x 2700.

Extranucleäre Körper bei *S. trifoliorum*. 68, 69 Ascogene Hyphenzellen 70, 71 Bei der Karyogamie im jungen Askus. 72, 73 Kurze einkernige Aski. 74, 75 Mittellange einkernige Aski. 76, 77 Einkernige Aski von definitiver Länge. 78, 79 Zwei- und vierkernige Aski. — Gentianaviolett mit verlängerter Einwirkung von Nelkenöl. — x 2700.

bar kärna samt verkliga ringbildningar (Fig. 74, 75). Under den fortsatta tillväxten minskas antalet successivt för att vid definitiv askuslängd uppgå till 6±1. Kropparna äro mot slutet av 1. profasen större och till formen

mera komplicerat byggda, vilket tyder på en sammansmältning av två eller flera av de tidigare mindre och enklare kropparna (Fig. 76, 77). Samma konfigurationer kunde återfinnas i flera olika kärnor även från olika biotyper av *S. trifoliorum*. Genom fixeringens inverkan skedde stundom en hopslagning av två eller flera av dessa kroppar till större komplex vid den basala och den apikala kortändan av den m. e. m. elliptiska zygotkärnan.

Under de tre kärndelningarna i askus äro de extranukleära kropparna försvunna (minskad färgbarhet eller verklig upplösning i cytoplasman?), men de uppträda i såväl 2- som 4-kärnstadierna (Fig. 76, 77) i ett antal av cirka sex kring varje kärna. Utanför sporernas vilkärnor (Fig. 55—56) förekomma de i successivt minskat antal; i 4-kärnstadiet kunde i vällyckade preparat endast en liten extranukleär kropp per kärna observeras. I det vegetativa mycelet, vars kärnor äro avkomlingar från dessa sistnämnda sporkärnor, observerades inga extranukleära kroppar av liknande slag. Med hänsyn till de mindre cell- och kärndimensionerna i mycelet är det dock möjligt, att dessa kroppar äro av så ringa storlek, att de med vanliga mikroskop ej kunna påvisas. Vid de askogena hyfkärnorna, vilka också äro avkomlingar från sporkärnorna, uppträda däremot som ovan påpekats med viss regelbundenhet en extranukleär kropp per kärna. Ehuru sambandet är mycket osäkert, finns det dock, med tanke på att dessa båda kärntyper i sporer respektive askogena hyfer i andra avseenden förete stora likheter (sid. 30 och 53), en viss möjlighet, att en verklig kontinuitet föreligger.

Det förefaller mig ej osannolikt, att den ovan beskrivna gruppen av extranukleära kroppar icke är enhetlig utan omfattar dels permanenta cytoplasmatiska beståndsdelar, dels m. e. m. betydelselösa produkter av kärnornas metaboliska verksamhet. Säkert är att åtminstone i de askogena hyferna dessa kroppar måste räknas som självständiga cellorgan. Huruvida avkomlingar från dessa ingå som en del eller utgöra samtliga av de extranukleära kropparna kring askuskärnorna och på så sätt genom sporerna upprätthålla kontinuiteten till nästa generation är däremot en mycket osäker fråga, som tills vidare måste lämnas öppen.

7. Cytologiska undersökningar av Sclerotinia sclerotiorum och S. borealis.

Båda dessa arter äro i växtpatologiskt avseende betydelsefulla; *S. sclerotiorum* orsakar en välbekant rötsjukdom på ett flertal växter, framförallt rotfrukter. *S. borealis* är känd som parasit på ett flertal odlade och vilda gräsarter i norra Sverige (EKSTRAND 1937, 1939).

Då dessa *Sclerotinia*arter ej tidigare studerats cytologiskt, utvalde jag dem till en dylik undersökning i hopp om att finna detaljer, som kunde styrka och eventuellt ytterligare belysa de ovan beskrivna iakttagelserna

hos *S. trifoliorum*. Det undersökta materialet var ej så omfattande som *trifoliorum*materialet men tillät dock vissa observationer av viktigare stadier i apothecieutvecklingen. Om man bortser från en del smärre i cytologiskt avseende obetydliga detaljavvikelser samt vissa morfologiska skillnader, överensstämmer utvecklingen av dikaryofas samt askus- och sporbildningen hos de båda arterna i alla väsentliga drag med *S. trifoliorum*. Beskrivningen av iakttagelserna har därför med stöd av ett antal figurer kunnat göras helt kortfattad.

S. sclerotiorum Schröt.

Sklerotiematerialet erhölls från rötskadade morötter. Sklerotierna lades till groning på fuktig sand januari 1939 och bildade rikligt med apothecier mars 1939.

S. sclerotiorum bildar apothecier från ensporkulturer (HENSON 1935). Liksom hos *S. trifoliorum* observerades inga differentierade sexualorgan. Cell- och kärndimensioner äro i hyferna i apothecieskaftens centrala vävnad i allmänhet mindre än hos föregående art. Askogoniala celler med till synes rent vegetativt ursprung stundom med anastomoser till omgivande vegetativa hyfer (Fig. 80, 81) bildas på flera olika ställen i den centrala vävnaden nära spetsen av de tillväxande apothecieskaften. Från dessa celler utväxa tvåkärniga askogena hyfer, vilka i sin tidigare utveckling äro mycket svåra att särskilja från de vegetativa, då dimensionerna i båda hyftyperna i det närmaste överensstämma. Någon tillfredsställande bild av cell- och kärndelningsmekanismen kunde därför ej erhållas på detta stadium. I de askogena hyfernas senare stadier (Fig. 82) försiggår celldelningen på samma sätt som hos *S. trifoliorum* med laterala anläggningar av bågar. Den primära askuskärnan är omedelbart efter karyogamien (Fig. 83, 84) ungefär av samma storlek och utseende som hos föregående art, och den meiotiska profasen förlöper även likartat med ett markerat stadium av minskad mottaglighet hos karyotinet för basiska färgämnen. Särskilt anmärkningsvärt hos denna art är, att nukleolens volym avsevärt minskas under profasens förlopp. De extranukleära kropparna äro färre till antalet än hos *S. trifoliorum* — i allmänhet fyra kring zygotkärnan i senare profasstadier — men ha i övrigt samma egenskaper och uppträda med samma regelbundenhet hos båda arterna. De under kärndelningarna i askus uppträdande kromosomerna äro hos *S. sclerotiorum* av samma storleksordning och utseende som hos *S. trifoliorum*; deras antal kunde icke med full säkerhet bestämmas men uppskattas till sex eller möjligen fem. Av preparaten framgick emellertid, att samma kromosomantal förekommer i alla tre delningarna. Kärnspolarna äro orienterade på samma sätt som hos *S. trifoliorum*; även sporbildningen sker likartat. En skillnad från föregående art är, att de mogna sporerna endast innehålla två kärnor (Fig. 92—95). Före den mitotiska delningen bildas på ömse sidor om

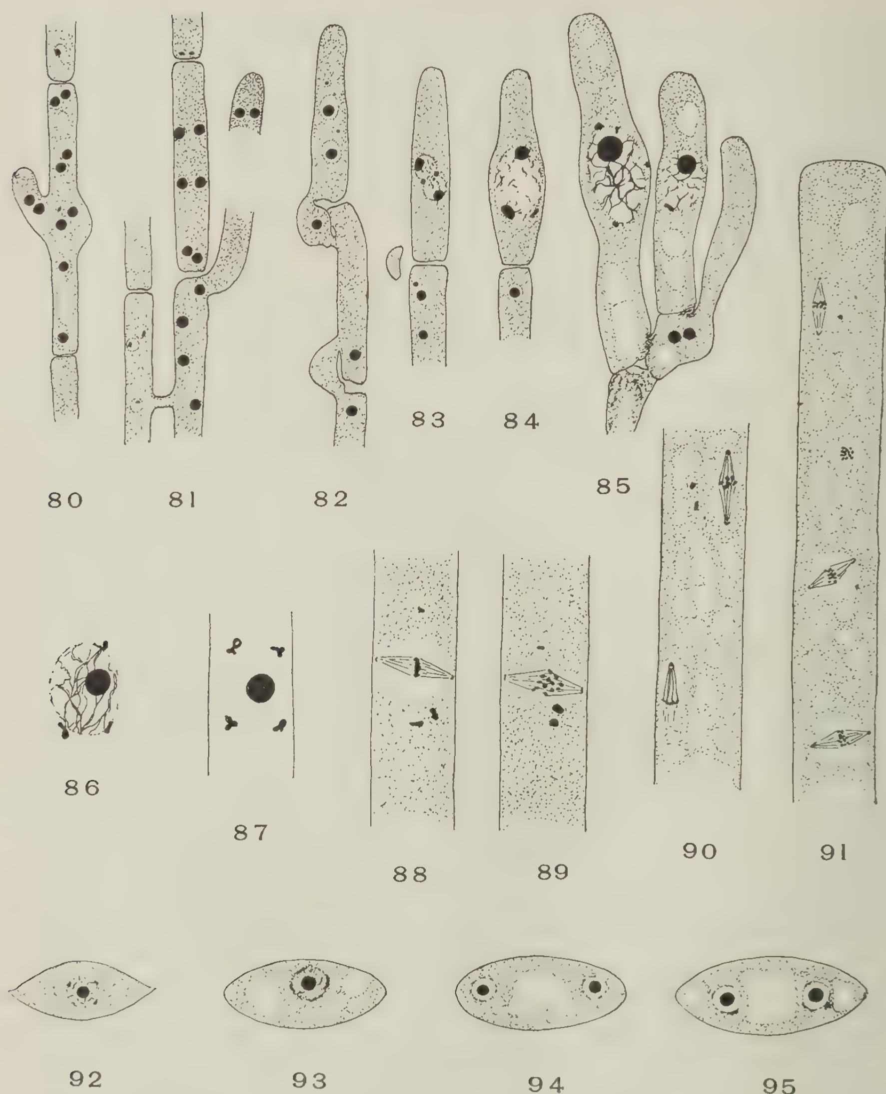


Fig. 80—95. *S. sclerotiorum.* 80, 81 Askogoniala celler. 82 Askogena hyfer. 83. 84 Karyogami i askus. 85 Transitorisk askusbildning. 86 Profas 1. 87 Extranukleära kroppar. 88, 89 Delning 1. 90 Delning 2. 91 Delning 3. 92–95 Sporutvecklingen. — 87 Gentianaviolett, övriga hämatoxylin — x 2700.

S. Sclerotiorum. 80, 81 Ascogoniale Zellen. 82 Ascogene Hyphen. 83, 84 Karyogamie im Askus. 85 Transitorische Askusbildung. 86 Prophase 1. 87 Extranucleäre Körper. 88, 89 Teilung 1. 90 Teilung 2. 91 Teilung 3. 92—95 Sporenentwicklung. — 87 Gentianaviolett, übrige Hämatoxylin — x 2700.

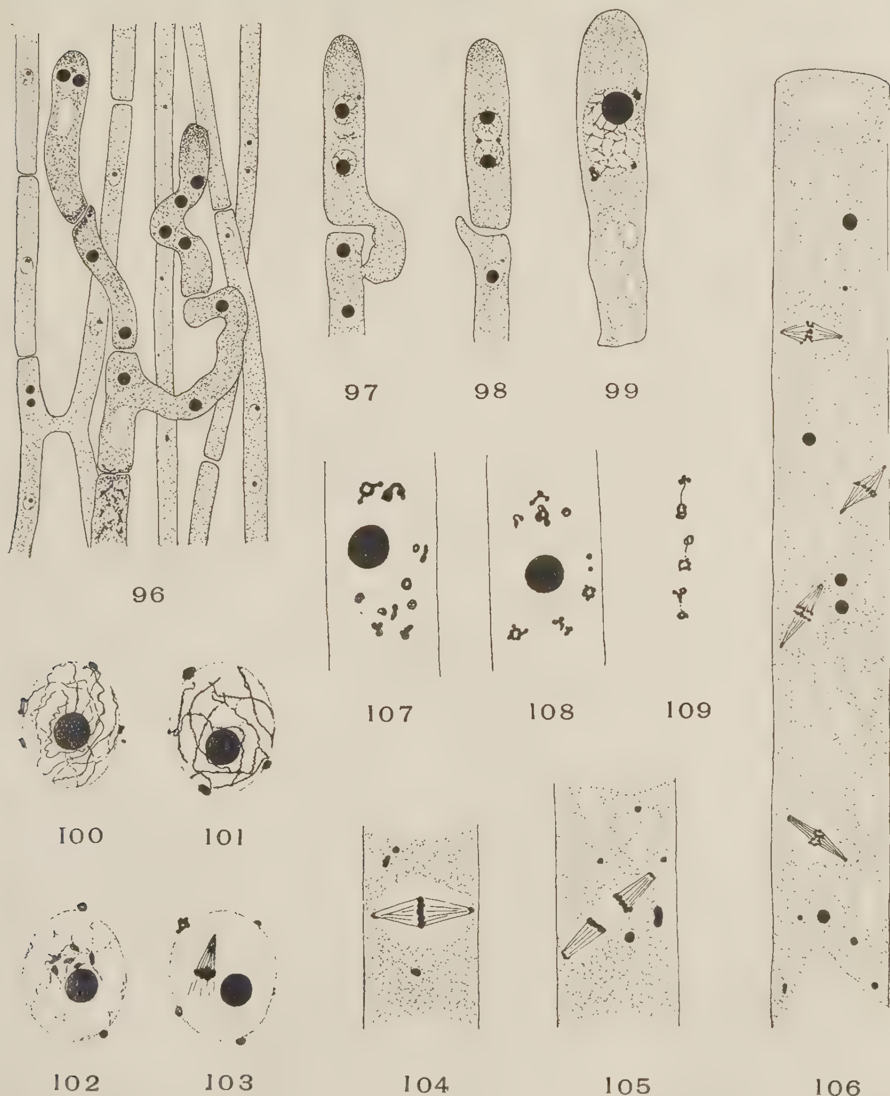


Fig. 96—109. *S. borealis.* 96 Askogoniala celler. 97 Askogena hyfer. 98, 99 Karyogami i askus. 100—103 Profas 1. 104, 105 Meta och anafas 1. 106 Delning 3. 107—109 Extranukleära kroppar i enkärniga aski. 96—106 Hämatoxylin; 107—109 Gentianaviolett — x 2700.

S. borealis. 96 Ascogoniale Zellen. 97 Ascogene Hyphen. 98, 99 Karyogamie im Askus. 100—103 Prophase 1. 104, 105 Meta- und Anaphase 1. 106 Teilung 3. 107—109 Extranucleäre Körper in einkernigen Aski. 96—106 Hämatoxylin; 107—109 Gentianaviolett — x 2700.

sporkärnan två vakuoler, vilka efter delningen sammanflyta till en stor central vakuol. I äldre stadier uppträda i regel dessutom terminala vakuoler (Fig. 95).

S. borealis, Bubák & Vleugel.

Sklerotiematerialet av denna art erhölls från assistenten vid Statens Växtskyddsanstalt fil. lic. H. Ekstrand, som under en tjänsteresa i Norrland insamlat detsamma. Sklerotierna lades till groning i fuktig sand i slutet av november 1940; apotheciebildningen började i mitten av januari 1941 och fortsatte ytterst rikligt under hela februari.

Cell- och kärndimensionerna i hyferna hos denna art äro av samma storleksordning som hos *S. trifoliorum* utom askuskärnorna, som ha en 10—20 % större diameter och aski, vilka på bredden visa en motsvarande ökad storlek. Liksom hos de båda föregående arterna observerades inga sexualorgan. Askogoniala celler (Fig. 96), från vilka tvåkärniga askogena hyfer utvecklades, iakttogos i apothecieskaftets centrala vävnad. Dikaryofasens utveckling synes försiggå på samma sätt som hos *S. trifoliorum*, i varje fall i senare stadier, där bågförbindelser mellan tvåkärncellerna observerades. Efter karyogami i den unga askusen (Fig. 98) igångsättes den meiotiska profasen med i huvudsak samma förlopp i de olika stadierna, som tidigare observerats. Karyotinet förekommer hos denna art i större mängd än hos de båda föregående, och då dessutom kärnorna äro större, kunna mera distinkt färgade preparat erhållas; det diffusa stadiet med minskad färgbarhet under profasens mitt finnes emellertid även hos denna art. Extranukleära kroppar i askogena hyfer, aski och sporer förekomma hos *S. borealis* på samma sätt som hos föregående arter. De uppträda emellertid under askusutvecklingen i större antal; kring den primära askuskärnan i senare profas observerades 10±1. De voro dessutom mera komplicerat byggda (Fig. 107, 108). I en del fall iakttogos bilder, som antydde delningar genom insnörning, så att två ofta olikstora kroppar uppstodo (Fig. 109). I två- och fyrkärnstadierna äro likaledes cirka 10 extranukleära kroppar av enklare form grupperade kring kärnorna.

Kromosomerna i askuskärndelningarna äro hos *S. borealis* något större än hos de föregående arterna. Man kunde därför vänta sig, att mera exakta iakttagelser angående kromosomtalet skulle låta sig göras. Detta var emellertid ej fallet, enär kromosomerna i samtliga observerade kärndelningsfigurer lågo mycket tätt tillsammans även i anafasstadierna. Uppskattningsvis kunde antalet beräknas ligga omkring sex, och samma tal synes förekomma i alla tre delningarna. I varje fall var det av preparaten att döma uteslutet, att någon ytterligare reduktion av kromosomtalet (brachymeios) äger rum i tredje delningen.

Kärnspolarnas orientering och sporbildningen sker på ett likartat sätt, som tidigare iakttagits. I de mogna sporerna, som äro betydligt större än

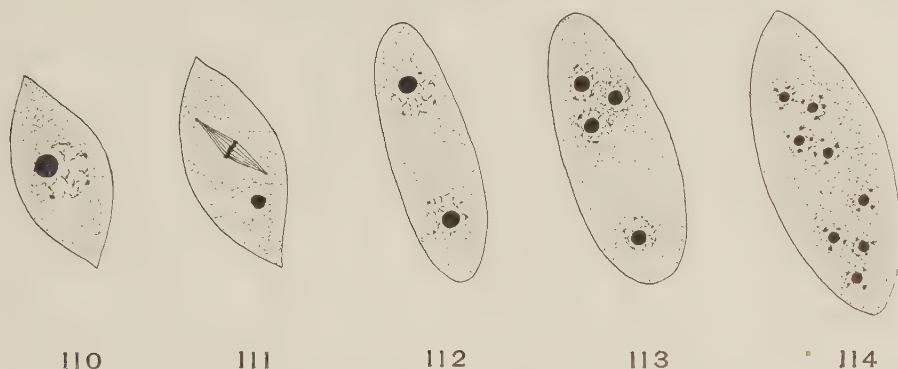


Fig. 110—114. *S. borealis*. — Sporutvecklingen. — Hämatoxylin — x 2700.
S. borealis. — Sporenentwicklung. — Hämatoxylin — x 2700.

hos de båda föregående arterna, finnas i regel åtta kärnor. I undantagsfall — dock oftare än vad fallet var hos *S. trifoliorum* — förekommer ytterligare en för alla kärnorna simultan mitotisk delning med 16-kärniga sporer till resultat.

Det kondriosomala materialet hos *S. borealis* företer i hyfer och aski, samt ifråga om distributionen till askosporerna vittgående likheter med motsvarande bilder hos *S. trifoliorum*.

Ovanstående iakttagelser hos *S. sclerotiorum* och *S. borealis* överensstämma, som tidigare påpekats, i alla väsentliga drag med de observerade cytologiska bilderna av *S. trifoliorum* och lämna sålunda ett visst stöd för de senares riktighet. Den mest iögonfallande skillnaden mellan de tre arterna ligger i sporstorleken och antalet kärnor i sporerna. De största sporerna ha samtidigt det högsta kärnantalet (*S. borealis* 8 (—16) kärnor). I vad mån detta förhållande kan anföras som ett bidrag till den bekanta, ehuru icke allmängiltiga kärn-plasma teorien (HERTWIG 1903), är svårt att yttra sig om, då det är uppenbart att endast mycket osäkra värden på kärn- och cellvolymer samt kärnytor kunna erhållas ur det föreliggande *Sclerotinia*-materialet trots de ifrågavarande kärnornas sfäriska form. Vad beträffar utvecklingen av sporerna inom var och en av de tre arterna, så bliva avkomlingarna till den primära sporkärnan tydligt mindre för varje delning. Även med hänsyn taget till det förhållandet, att de definitiva sporkärnorna (resp. 2, 4, 8) sannolikt äro kontraherade i fixerade preparat, förefaller det som om den sammanlagda kärnvolymen icke väsentligt förändras under sporutvecklingen. Någon avsevärd ökning kan det i varje fall icke vara tal om. Flerkärnigheten medför emellertid ökad kontaktyta mellan cytoplas-

man och kärnsubstansen även vid oförändrad sammanlagd kärnvolym. Om den sistnämnda icke förändras under sporutvecklingen t. ex. hos *S. borealis,* ökas från en- till åttakärnstadiet kärnytan till det dubbla. Detta är givetvis fördelaktigt för den metaboliska verksamheten i cellen, i synnerhet vid sporgroningen, vilken under lämpliga miljöbetingelser börjar så gott som omedelbart efter sporerna kastats ut från askus, i varje fall beträffande *S. trifoliorum* (jfr fig. 120). Flerkärnigheten i sporerna kan alltså även tolkas som en beredskapsåtgärd för att högt vitala hyfer snabbt skola kunna utvecklas.

Beräkningen av kärnytans ökning i specialfallet med oförändrad kärnvolym vid delningar av sfäriska kärnor resulterande i sinsemellan likstora dotterkärnor inom samma cell erbjuder inga svårigheter enligt följande enkla formel: $s = \sqrt[3]{n}$, där s angiver huru många gånger ytan ökats om n är lika med antalet genom sista kärndelningen bildade kärnor.

IV. Mikrokonidier.

Föregående undersökningar. Mikrokonidierna hos *S. trifoliorum* beskrevos först såsom sporidier av Rehm (1872) och Jakob Eriksson (1880); sedermera av Brefeld (1891) under benämningen konidier. Samtliga dessa författare synas endast ha iakttagit utvecklingen från groende askosporer i vattendroppkultur. Enligt Brefeld orsakas mikrokonidiebildningen av näringsbrist. Andra undersökningar utförda av de Bary (1886), Peglion (1916) men framförallt av Coleman (1907) gåvo emellertid vid handen, att dessa kroppar utvecklas under andra, icke närmare klarlagda förhållanden. Coleman, som konstaterade skillnader i fråga om bildad mikrokonidiemängd hos olika stammar av *S. trifoliorum,* antog att närvaron av någon speciell ämnesomsättningsprodukt i eller utsöndrad från myceIet skulle vara bestämmande för utvecklingen av mikrokonidierna. Han utförde även en del försök med tillsats av 2.5 % oxalsyra till agarkulturer, vilka emellertid utföllo negativt. Samme författare påpekade också, att i kulturer med riklig mikrokonidiebildning endast få eller inga alls sklerotier utvecklades samt att å andra sidan kulturer med påfallande få mikrokonidier i regel uppvisade riklig sklerotiebildning. Coleman iakttog vidare mikrokonidiebildning från mycel, som vid hög luftfuktighet utväxte från infekterade klöverplantor. — Bland senare undersökningar, i vilka mikrokonidiefrågan omnämnts, må nämnas Gilbert och Bennet (1917), Nilsson-Leissner och Sylvén (1927) samt Nicolaisen et al. (1940).

Hittills ha samtliga försök att bringa dessa kroppar till groning misslyckats.

Egna undersökningar. Trots att åtskilliga försök utförts i syfte att klarlägga de faktorer, som reglera mikrokonidiebildningen har det ej varit mig möjligt, att i nämnvärd grad belysa denna fråga. Av försöken framgick emellertid en sak av verklig betydelse, nämligen att man måste skilja på den så att säga normala bildningen av dessa kroppar inom en viss biotyp och den mikrokonidiebildning, som sker då mycel från två eller flera olika biotyper växa samman. Då mikrokonidierna vidare enligt min uppfattning icke spela någon väsentlig roll i svampens utvecklingshistoria, äro de ne-

danstående anteckningarna i varje fall angående den normala, intrabiotypiska mikrokonidiebildningen av mera fragmentarisk karaktär och ha medtagits för fullständighetens skull.

1. Intrabiotypisk mikrokonidiebildning.

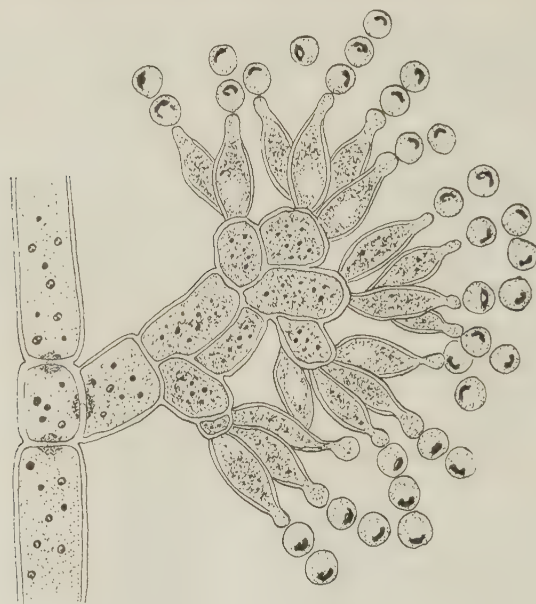
I första hand fullföljdes de av COLEMAN påbörjade försöken med oxalsyretillsats till agarkulturer. I dessa visade varierande koncentrationer av detta ämne ingen som helst effekt, vilket ej heller var fallet med åtskilliga organiska och oorganiska salter i vattenlösning. Vidare prövades tillsats till agarkulturer i olika utvecklingsstadier av filtrerat extrakt från äldre näringslösningskulturer av svampen ifråga likaledes med negativt resultat. Vid dessa senare försök gjordes hål i agarn i vilka extraktet hälldes. Det är möjligt, att detta förfaringssätt ej är fullt tillförlitligt, och att positiva resultat kunna erhållas medelst en förbättrad metodik.

En viss hämmande effekt erhölls i ett luftfuktighetsförsök med en biotyp, i det att agarplattor utan lock i fuktig kammare visade en avsevärd minskning av mikrokonidiebildningen i jämförelse dels med kontrollerna (plattor under normala förhållanden, d. v. s. med lock), dels med plattor i torr luft. I ett par av plattorna i den fuktiga kammaren utvecklades överhuvudtaget inga mikrokonidier. Mellan kontrollerna och plattorna i torr luft märktes ingen skillnad.

En tydlig ökning av mikrokonidiebildningen observerades från askosporer liggande på hymenieytan av apothecier, som några timmar exponerats i laboratorieluft på så sätt, att locket till kulturburkarna avtagits, varefter apothecierna fått vidareutvecklas i slutna burkar. Kontroller behandlade på samma sätt i fria luften utomhus reagerade icke på detta sätt. I anslutning till detta experiment exponerades en del agarplattor med kulturer i laboratorieluft under varierande tider; andra plattkulturer fingo växa i etylenatmosfär (öppna plattor tillsammans med äpplen under glasklockor). I det första fallet erhöllos inga entydiga resultat; de i etylenatmosfären växande kulturerna visade däremot en märkbar ökning i mikrokonidiebildningen.

Vid ympning med stora spormängder av samma biotyp på små agarytor — cirka 100 000 sporer på ungefär 1 cm^2 yta — inträffade en tidigare och rikligare mikrokonidiebildning i ympstället än vid ympning med färre sporer eller med mycel.

En allmän iakttagelse rörande den normala mikrokonidiebildningen, som i agarkulturer i allmänhet gjorde sig märkbar efter 10—14 dagar vid 18°, var slutligen, att denna började i centrum vid ympstället för att sedan långsamt sprida sig mot periferien. Detta inträffade vare sig ympningen utfördes med agarbitar innehållande mycel, delar av sklerotier eller en



115

Fig. 115. Mikrokonidier ur en agarkultur. — Hämatoxylin — x 1350.

Mikrokonidien aus einer Agarkultur. — Hämatoxylin — x 1350.

enda spor, varför någon övervägande inverkan av ämnen i ympmaterialet på det närliggande mycelet knappast är tänkbar.

I stort sett stödja dessa spridda iakttagelser COLEMANS förmodande om, att närvaron av någon ämnesomsättningsprodukt är bestämmande för igångsättandet av mikrokonidiebildningen. I det normala ovan relaterade fallet med endast ett ympställe per platta börjar bildningen på den plats, där det äldsta och mest kompakta mycelet befinner sig, och där det alltså är störst sannolikhet för att en eventuellt verksam ämnesomsättningsprodukt först skall uppnå tillräcklig koncentration för effekt. I fallet med massympning av genetiskt lika askosporer på begränsade ytor bildas en mängd närliggande vegetationspunkter (hyfspetsar), var och en i livlig metabolisk verksamhet. Förutsättningen för en snabb koncentration av ämnesomsättningsprodukter däribland den eller de för mikrokonidiebildningen eventuellt nödvändiga är alltså även i detta fall för handen. Den stimulerande effekten av laboratorieluft och etylenatmosfär kan sannolikt tolkas som ett utslag av en ämnesomsättningsstörning i riktning mot bildning av den verksamma produkten. Den hämmande effekten av fuktighets-



Fig. 116. Interbiotypisk mikrokonidiebildning. Vänster platta ympad med cirka 1000 sporer ur 10 A—1; höger med cirka 1000 sporer ur Sval 17—1; mellersta plattan med cirka 500+500 ur vardera 10 A—1 och Sval 17—1.

Interbiotypische Mikrokonidienbildung. Die linke Platte geimpft mit zirka 1000 Sporen aus 10 A—1; rechts mit zirka 1000 Sporen aus Sval 17—1; die mittlere Platte mit zirka 500+500 aus sowohl 10 A—1 als auch Sval 17—1.

mättad atmosfär över kulturerna kan möjligen förklaras genom antagandet, att den ifrågakommande ämnesomsättningsprodukten är vattenlöslig, och att den effektiva koncentrationen i centrum av plattan aldrig uppnås därigenom att luftfuktigheten i form av kondensvatten på kulturytan har en utjämnande verkan. Till slut måste det framhållas, att dessa spekulationer givetvis äro osäkra, och att de faktorer, som reglera den normala, intrabiotypiska mikrokonidiebildningen äro långt ifrån klarlagda.

I agarkulturer bildas mikrokonidierna från rikt förgrenade konidiebärare, vilka tidigare morfologiskt beskrivits av flera författare. Några avbildningar av dessa har jag dock icke påträffat i klöverrötelitteraturen, varför figur 115 medtagits. I de sfäriska mikrokonidierna observeras förutom en central droppe av någon färglös vätska, vilken även synes i levande material, en excentrisk skärformad kropp, som starkt färgas av hämatoxylin och gentianaviolett. Denna kropp representerar sannolikt kärnan eller nukleolen. Liknande strukturer ha tidigare iakttagits i mikrokonidierna hos *Sclerotinia fructicola* (Wint.) Rehm (Heuberger 1934).

2. Interbiotypisk mikrokonidiebildning.

Riklig och över hela plattan snabbt insättande bildning av mikrokonidier erhölls dels vid sporspridningar från heterokaryotiska apothecier (sid. 103) på näringsagar, dels vid ympning med askosporer från olika biotyper på

samma agarplatta. Detta fall är icke jämförbart med det ovan relaterade, där mycket stora spormängder av samma biotyp per ytenhet kommit till användning, enär den märkbara ökningen i mikrokonidiebildningen även inträffade vid relativt små sammanlagda spormängder (Fig. 116). I kontrollerna med genetiskt enhetligt spormaterial av samma täthet var f. ö. mikrokonidiebildningen normal (Fig. 116). — Vid odling av två eller flera olika biotyper av svampen på en och samma agarplatta uppkomma i hopväxningslinjerna mellan de olika mycelen mycket markanta vita linjer med tät mikrokonidiebildning (Fig. 132, 134, 135). Dessa linjer bildas ej, då mycel från samma biotyp ympas på skilda ställen på samma platta. För närmare beskrivning och diskussion av detta fenomen hänvisas till sid. 98.

3. Mikrokonidiernas funktion.

I tidigare arbeten om *Sclerotinia trifoliorum* ha i huvudsak två olika dock icke av försök stödda antaganden framförts rörande mikrokonidiernas funktion, nämligen å ena sidan, att de skulle spela en roll vid infektionen av värdväxten och å andra sidan att de skulle funktionera som spermatier vid en förmodad befruktningsprocess. För att undersöka hållbarheten i det första antagandet utförde jag en del infektionsförsök med mikrokonidier i olika ålder på sårade och osårade blad och stjälkar av rödklöver. Försöken, som gjordes under varierande temperatur- och fuktighetsbetingelser, hade samtliga ett negativt förlopp. Kontroller med mycel-, askospor- och sklerotiemjölinfektioner av samma svampbiotyper på samma klövermaterial (rödklöverkloner) gåvo samtliga lyckade infektioner.

Det andra antagandet, nämligen att mikrokonidierna skulle medverka vid en eventuell befruktningsprocess förtjänar att närmare diskuteras. Ett flertal nyare undersökningar huvudsakligen utförda i U. S. A. ha visat, att mikrokonidierna hos många askomyceter med stor sannolikhet fungera som spermatier, d. v. s. de spela en aktiv roll vid befruktningen genom att vid uppkomsten av dikaryofasen tillföra den ena av de två kärnorna. Även om fullt bindande cytologiska bevis härför ännu icke i något fall föreligga, förefaller det genom de biologiska försök och morfologiska iakttagelser, som hittills gjorts, mycket sannolikt, att så verkligen är fallet.

En av ARNAUD och BARTHELET (1936) framställd hypotes enligt vilken mikrokonidierna genom en fysiologisk, icke sexuell inverkan skulle giva impulsen till den dikaryotiska fasens uppkomst, kan i brist på tillförlitliga försök icke tillmätas någon större betydelse. Dessa författare stödja sig huvudsakligen på vissa försöksresultat med *Neurospora*, som uppnåtts av MOREAU och MORUZZI (1931), vilka resultat emellertid allvarligt kritiserats av bl. a. DODGE (1931) och SWINGLE (1934).

De för den här föreliggande undersökningen mest intressanta amerikan-

ska resultaten från spermatiseringsförsök äro de, som uppnåtts av DRAYTON (1932, 1934, 1937), GREGORY (1938) samt GROVES och DRAYTON (1939), framför allt med *Sclerotinia Gladioli* (Massey) Drayton. Hos denna svamp, som är självsteril, erfordras nämligen tillsats av mikrokonidier från en annan biotyp av arten för att apothecier skola utvecklas. Andra liknande resultat huvudsakligen uppnådda med pyrenomyceter finnas refererade hos WHETZEL (1937). WHETZEL anser så många bärkraftiga bevis för mikrokonidiernas befruktningsfunktion föreligga, att han föreslår ett slopande av termen mikrokonidium (l. c. p. 135) och vill ha den generellt ersatt med den av TULASNE (1852) införda benämningen spermatium. I en sammanställning över nyare undersökningar av askomyceternas utvecklingshistoria upptager GÄUMANN (1940) denna fråga till behandling och påvisar på ett övertygande sätt det olämpliga i ett generellt användande av uttrycket spermatium. I den föreliggande undersökningen har jag haft och har fortfarande samma uppfattning, varför jag anslutit mig till den av GÄUMANN förordade terminologien och bibehållit uttrycket mikrokonidium.

Beträffande *S. trifoliorum* anser jag det ytterst osannolikt, att mikrokonidierna spela någon roll vid uppkomsten av de askogena hyferna och följaktligen ej heller vid apotheciebildningen i övrigt. I första hand stöder jag mig då på de cytologiska resultaten, som med största sannolikhet utesluta spermatieteorin. I andra hand kan följande försök anföras. Ett antal kultursklerotier av en viss rikligt apotheciebildande biotyp (Sval 17-1) neddoppades i 95 % alkohol och antändes därefter för att effektivt döda eventuella mikrokonidier på sklerotiernas yta, varefter de placerades i skålar med steril fuktig bomull. Andra sklerotier av samma biotyp behandlades med 1 % sublimat respektive 2 % formalin, varefter de tvättades i sterilt vatten och lades till groning enligt ovan. Obehandlade kontroller ingingo i försöket. Samtliga försöksled bildade normala apothecier. Det framkom vidare ingen signifikativ skillnad i apotheciebildningen mellan de olika försöksleden. Under försökets gång uttogos prov, som granskades under preparermikroskop, varvid ingen mikrokonidiebildning varken på sklerotiernas yta eller på de uppväxande skaften kunde iakttagas. Detta försök är emellertid ej helt oangripbart, emedan det är teoretiskt möjligt, att livsdugliga mikrokonidier under själva sklerotiebildningen inneslutits i sklerotierna och där befruktat vegetativa hyfer. Om så skulle vara fallet, är jag emellertid övertygad om att det med nuvarande tekniska cytologiska hjälpmedel icke är möjligt att iakttaga en dylik process.

En befruktning av detta slag hos *S. trifoliorum* är osannolik även av den anledningen att många sklerotier synbarligen bildas utan att mikrokonidier inneslutas i dem. Vidare giva de föreliggande cytologiska resultaten hos denna art, som ovan nämnts, inget som helst stöd åt en sådan uppfattning.

Då nu otvivelaktigt mikrokonidierna hos *S. trifoliorum* och spermatierna hos *S. Gladioli* äro homologa organ, uppstår frågan varför de förra äro utan funktion och de senare funktionerande. Svaret härpå är förmodligen att söka i det förhållandet att *S. trifoliorum* är självfertil, varför mikrokonidierna äro överflödiga; den dikaryotiska fasen hos denna art bildas direkt från vegetativa hyfer. *S. Gladioli* däremot är självsteril och fordrar för bildningen av sin dikaryotiska fas sannolikt kärnor med avvikande genetisk konstitution. Tillförandet av dessa kan ske genom spermatier från annan biotyp.

Till slut uppstår frågan om man med ledning av dessa sannolika förhållanden kan uppställa någon hypotes angående *Sclerotinia*arternas inbördes placering i utvecklingshistoriskt avseende. Från den av GÄUMANN-DODGE (1928) uppställa teorien om en gradvis tillbakabildning av de sexuella organen inom flertalet askomycetgrupper kan ett i viss mån parallellt exempel hämtas, nämligen från den sannolika utvecklingen av en serie lavar. Hos *Collema crispum* (BAUR 1898) och *C. pulposum* (BACHMAN 1912) förekomma spermatiebefruktning av trichogyn; hos *Anaptychia ciliaris* (BAUR 1904) finnas visserligen såväl spermatier som trichogyn, men ingen befruktning sker utan den dikaryotiska fasen bildas direkt från askogoniala celler. Hos andra lavar i denna serie når tillbakabildningen av sexualorganen ännu längre genom ett gradvist försvinnande av spermatier och trichogyn.

Det existerar otvivelaktigt en viss analogi mellan å ena sidan *Collema-Anaptychia* och å andra sidan *Sclerotinia Gladioli-trifoliorum*. *S. trifoliorum* skulle alltså enligt denna allmänt accepterade teori vara att betrakta som en mindre ursprunglig typ än *S. Gladioli*. Under förutsättning, att denna teori är riktig skulle *S. trifoliorum* kunna betecknas som en sekundär monöcist (GREIS 1941), ehuru de stabila och enkla sexualitetsförhållandena hos det föreliggande materialet av arten (jfr. Kap. VI och VII) icke tillåta några säkra slutsatser angående förekomsten av realisatorgener.

I detta sammanhang äro vidare några uttalanden av BULLER (1941) av intresse. »In the Discomycetes, there can be little doubt: that the typical primitive form of sexuality is that of heterothallism, as displayed by — and that the homothallic species — have been derived from heterothallic ancestors» (l. c. p. 357). Detta generella uttalande, vars tillämplighet på *S. trifoliorum* sannolikt är befogad, innebär alltså, att endast sekundära monöcister skulle finnas inom denna askomycetgrupp. Då nu GREIS (1941) genom omfattande undersökningar visat, att *Sordaria fimicola* (som visserligen tillhör pyrenomyceterna) är en primär monöcist, synes det, med hänsyn till att många primitiva diskomyceter ännu icke äro undersökta, osäkert om BULLERS uttalande kan äga generell giltighet.

Buller yttrar vidare med stöd av de förut omnämnda (sid. 69) amerikanska undersökningarna angående självsterila *Sclerotinia*arter, att (l. c. p. 349) »Thus the investigations of — — — indicate that *Sclerotinia* as a genus is heterothallic rather than homothallic — — —». Enligt andra amerikanska undersökningar (Henson 1935) har det emellertid visats, att två av släktets mest bekanta och ekonomiskt mest betydande arter, nämligen *S. trifoliorum* och *S. sclerotiorum* äro homothalliska. Enligt muntligt meddelande från H. Ekstrand, Stockholm, är dessutom *S. borealis* Bubák & Vleugel homothallisk.

V. Vegetativ utveckling.

1. Askosporernas groning.

Föregående undersökningar. I flera äldre arbeten om klöverrötan (Rehm, Brefeld m. fl.) har sporgroningens morfologi beskrivits. Sporernas groning och hyfernas inträngande i värdväxten har vidare utförligt beskrivits av Coleman (1907). Fältstudier av sporinfektionsförloppet ha utförts av Henson, Valleau och Fergus (1933).

Egna undersökningar. I vatten utan näringssalter eller organiska ämnen bilda askosporerna som tidigare omnämnts mikrokonidier antingen direkt eller från korta konidiebärare. På näringssubstrat utväxa hyfer från en eller flera godtyckliga punkter på sporens yta. Samtidigt med eller omedelbart innan anläggningen av groddslangarna försiggå delningar i de fyra sporkärnorna, så att den groende sporen blir åttakärnig (Fig. 117). Hyfernas tillväxt försiggår på samma sätt som tidigare beskrivits av de Bary och Brefeld för *Sclerotinia sclerotiorum*. Dimensionerna av de vegetativa hyferna i agarkulturer variera mycket; cellbredden mellan 1.5 och 22 μ, längden från 10 till omkring 200 μ. I smalare hyfer äro cellerna i genomsnitt längre än i bredare. Anastomoser mellan hyferna förekomma talrikt. I de smalare cellerna varierar kärnantalet från 5 till omkring 20; i vissa av de största cellerna beräknades antalet uppgå till mellan 150 och 250 (Fig. 118). Tvärväggarna äro liksom hos åtskilliga andra askomyceter försedda med en central por, genom vilken plasma och ljusbrytande droppar kunna ses passera. Passagen genom tvärväggarna mellan äldre celler är tillstängd medelst m. e. m. linsformade proppar av en med basiska färgämnen svagt färgbar substans. Liknande bildningar ha tidigare beskrivits hos några andra askomyceter under olika benämningar: sferical pads hos vissa *Lachnea*arter (Fraser 1907, 1913), kallusliknande ansvällningar hos *Humaria aggregata* (Rosenberg 1933).

Mellan de från de groende sporerna utväxande hyferna bildas ofta anastomoser (Fig. 119). Dessa bildningar uppstå med till synes samma



Fig. 117, 118. 117 Groende sporer. 118 Äldre vegetativ hyfcell. — Hämatoxylin — x 1000.

117 Keimende Sporen. 118 Ältere vegetative Hyphenzelle. — Hämatoxylin — x 1000.

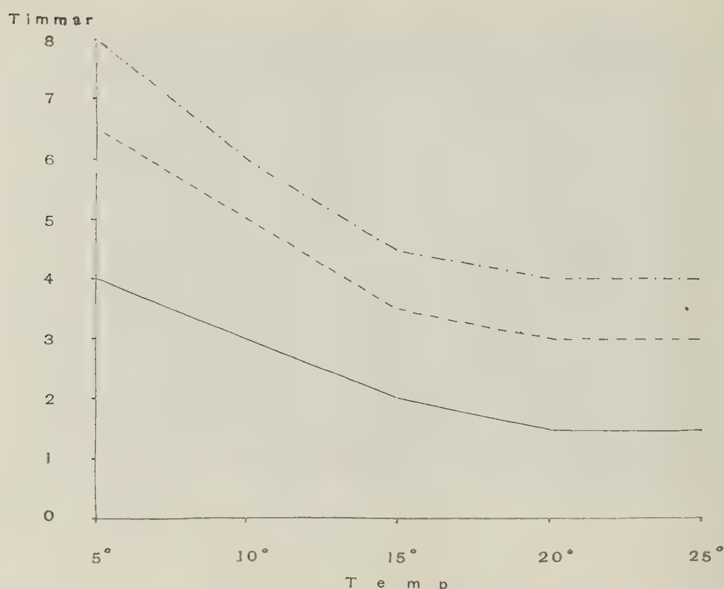
frekvens såväl i genetiskt enhetligt spormaterial som i sporblandningar av olika biotyper. Detta förhållande tyder på att heterokaryotiska mycel så gott som omedelbart kunna bildas i en groende sporpopulation.

Grobarheten hos askosporer, som utkastas från unga apothecier, är mycket hög. En del groningsbestämningar ha utförts med sporer i hängande droppe (1 % glykos i vattenlösning). Groningsprocenten, som erhölls genom räkning av 500 sporer per biotyp efter 48 timmar, var för sju olika biotyper följande 95, 96, 96, 96, 96, 97, 98 %. Av de icke grodda sporerna voro en del så gott som fullständigt uttömda på plasma, vilket möjligen kan förklaras av att de tidigare liggande på apotheciets yta bildat mikrokonidier. Några sporer visade plasmolys eller annan deformering; dessa utgjordes antagligen av icke färdigbildade, groningsomogna individ. Liknande bestämningar av spormaterial från äldre apothecier samt från apothecier, som tidigare utsatts för frost, visade åtskilligt lägre groningsprocent, varierande mellan 60 och 90. Större delen av de icke grodda sporerna i dessa prov bestod av m. e. m. fullständigt plasmatomma individ. En viss halt av mikrokonidier i proven tydde på, att oförmågan till groning härrörde sig från tidigare mikrokonidiebildning.



Fig. 119. Anastomosbildning mellan hyferna från groende sporer.
Anastomosbildung zwischen den Hyphen von keimenden Sporen.

Om de grodda sporernas förmåga att vidareutvecklas till större mycel med följande sklerotiebildning lämnade siffrorna från ensporkulturerna besked. Ur sporspridningar från 81 stammar och 16 biotyper isolerades genom uttagning med ympnål inalles 1 382 groende sporer; av dessa utvecklades 1 331 till fullständiga kolonier med sklerotier. Det skulle i dessa försök bliva missvisande med groningsprocent i de olika fallen, då från några biotyper endast några få sporer uttogos, men i intet fall utväxte mindre än åtta av tio isoleringar. I regel misslyckades endast en à två av femtio. De misslyckade isoleringarna torde i några fall bero på att sporerna blivit skadade av nålen, i andra på att de gått förlorade vid överflyttningen. I några fall observerades ofullständig och ojämn mycelutveckling från en del grodda sporer isolerade ur sporspridningar från ett par homo- och ett par heterokaryotiska apothecier. Mycelutvecklingen begränsades i några av ensporkulturerna till ett par 100-tal μ; i andra var utvecklingen avsevärt fördröjd och i en del slutligen fullt normal. Vid närmare undersökning av de miljöförhållanden, under vilka de ifrågavarande apothecierna utvecklats, visade det sig, att en natt några dygn före sporspridningen en för årstiden helt oväntad nattfrost inträffat. Jag håller det därför för mycket troligt, att den oregelbundna mycelutvecklingen i dessa fall orsakats av temperaturstörningar och således kan betraktas som rent modifikativ. Denna utförliga redogörelse för sporernas groningsförhållande har medtagits för att visa, att det i det undersökta spormaterialet från under kontrollerade miljöförhållanden utvecklade apothecier (temperatur



120

Fig. 120. Diagram över askosporernas groningstid vid olika temperaturer. Begynnande groning ——. 50 % groning — — —. 90 % groning —.—. .

Diagram über die Keimungszeit der Askussporen bei verschiedenen Temperaturen. Beginnende Keimung ———. 50 % Keimung — — —. 90 % Keimung - -.—.—.

5—20°, diffust ljus, hög luftfuktighet) icke förekom några aborteringsfenomen i form av ofullständig mycelutveckling efter groningen.

Temperaturens inverkan på groningstiden framgår av ovanstående diagram. Bestämningarna utfördes med sporer från samma biotyp i hängande droppe (1 % glykos i destillerat vatten).

Av diagrammet framgår, att groningen började redan efter en och en halv till ett par timmar. Resten av de utvecklingsdugliga sporerna — från 90 till 95 à 98 % — grodde inom de närmaste 24 timmarna. I vattenledningsvatten och i fuktig atmosfär utan flytande medium skedde groningen på 20—25 % kortare tider, i det sistnämnda fallet dock mycket oregelbundet. Av groningsmediet betingade skillnader i groningstiden är ett förhållande, som tidigare angivits för en del andra parasitära svampar (Fischer-Gäumann 1929).

2. Mycelets tillväxt vid olika temperaturer.

Föregående undersökningar. Pape (1937) bestämde mycelets tillväxthastighet på näringsagar vid olika temperatur hos en del olika stammar av *S. trifoliorum.*

Endast smärre och förmodligen icke signifikativa skillnader konstaterades. Minimum, optimum och maximum beräknades till respektive 0°, 16.5° - 19° och 33°.

De av PAPE funna värdena på optimumtemperaturerna, vilkas tillämplighet på ett par biotyper i mitt *Sclerotinia*material jag hade tillfälle att konstatera, äga ett visst intresse. De avvika nämligen väsentligt från de temperaturvärden, vid vilka man i naturen finner svampens optimala utbredning genom vegetativ mycelväxt på klöverplantorna. Detta sker enligt åtskilliga iakttagare (NILSSON-LEISSNER och SYLVÉN 1927 m. fl.) samt egna observationer under den kallare delen av året. NILSSON-LEISSNER och SYLVÉN (l. c. p. 141) ha påvisat, att milda vintrar gynna klöverrötan. Detta har senare bekräftats av KLEMM (1938), som konstaterar ett tydligt samband mellan kraftiga klöverrötehärjningar och över det normala liggande temperaturer under november.

I Skåne sker under år med normal vintertemperatur den kraftigaste mycel-tillväxten och spridningen från planta till planta vanligen under november samt i mindre grad under december och mars. Medeltemperaturerna för dessa månader ligga enligt Statens meteorologisk-hydrografiska anstalts årsbok mer än 10° lägre än den optimala temperaturen för tillväxten i kultur. Även under exceptionellt milda vintrar är medeltemperaturen i det fria under dessa månader omkring 10° lägre än den optimala kulturtemperaturen. På grund av dessa väsentliga skillnader kunde man ha anledning att misstänka, att klöverrötan utan vidare skulle kunna inrangeras i den av FISCHER och GÄUMANN (1929) uppställda *Gibberella-Thielavia*gruppen av de parasitära växtsjukdomarna. Utmärkande för denna grupp är nämligen, att temperaturoptimum för parasitens vegetativa tillväxt i kultur ligger på ett helt annat ställe än optimum för sjukdomens uppträdande. Orsaken till denna förskjutning anses ligga i en termiskt betingad depression av värdväxtens resistens (FISCHER-GÄUMANN 1929 p. 195).

Egna undersökningar. För att närmare studera denna fråga utförde jag ett par jämförande tillväxtförsök med mycel vid olika temperaturer dels på näringsagar dels på levande klövermaterial. Vid några mindre, förberedande försök konstaterades genom dagliga mätningar, att mycelets tillväxthastighet var olikformig; såtillvida att tillväxten under de första dagarna var obetydlig för att därefter avsevärt tilltaga. Detta förhållande är tidigare bekant från åtskilliga andra svampar och enligt FISCHER-GÄUMANN är det därför nödvändigt att som exakt mått använda den genomsnittliga dagliga tillväxten, då denna vid en viss temperatur blivit konstant. Detta är emellertid ofta särskilt vid lägre och högre temperaturer svårgenomförbart och i praktiken torde man därför i många fall få nöja sig med något mindre exakta metoder.

I mina jämförande försök använde jag av tekniska skäl som mått på tillväxten den tid som åtgick från ympningen till bildningen av sklerotier. Sklerotiebildningen hos de i försöket ingående svampbiotyperna inträffade nämligen mycket regelbundet en viss tid efter mycelet vuxit ut till kanten av de använda petriskålarna med näringsagar eller genom de infekterade klöverbladstjälkarna. Av dagliga mätningar under tiden från ympningen till sklerotiebildningen framgick, att mycelets tillväxthastighet, såsom ovan påpekats, var olikformig under hela denna tid. Av dessa mätningar kunde emellertid också utläsas, att förhållandet mellan tillväxthastigheten vid de olika temperaturerna under en viss kortare period var ungefär detsamma som förhållandet mellan sluttiderna. Jag är således fullt medveten om, att denna metod icke ger några exakta upplysningar om de konstanta tillväxthastigheterna vid olika temperaturer, men det förefaller mig, som om värdena på sluttiderna dock kunna tjäna som underlag för en uppfattning om mycelets utveckling vid olika temperaturer.

Klövermaterialet bestod av likgamla och likstora blad med stjälkar från plantor tillhörande en och samma klöverklon (K 22). Bladstjälkarna avklipptes lika långa och desinfekterades genom noggrann avtorkning och följande nedsänkning i 0.2 % sublimatlösning under 3 minuter. Efter sköljning i tre omgångar sterilt vatten stuckos stjälkarna genom hålförsedda korkar i burkar med steril näringsagar, så att nedre delen av stjälken nätt och jämnt vidrörde agarn (Fig. 121). Mellanrummet mellan stjälk och kork tätades med steril bomull. Infektionsmaterialet bestod av likstora agarkuber innehållande mycelspetsar, vilka utskurits från kanten av unga i tillväxt varande plattkulturer. Två olika svampbiotyper — Sval 6-44 och Sved 4-1 — ingingo i försöket.

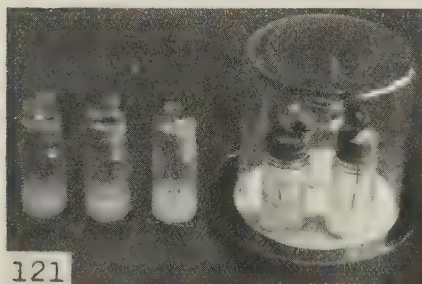




Fig. 121, 122. Anordning för infektion av klöverblad. 121 Nyligen infekterade. 122 Sklerotiebildning på näringsagar sedan mycelet växt genom bladstjälkarna.

Vorrichtung zur Infektion von Kleeblättern. 121 Vor kurzem infiziert. 122 Sclerotienbildung auf Nahrungsagar, nachdem das Myzel durch die Blattstiele gewachsen ist.

Infektionen av klöverbladen tillgick på så sätt, att agarkuben med mycelytan placerades mot ett av de tre delbladen. Mycelet växte därifrån genom bladstjälken ned till näringsagarn, där sklerotiebildning inträffade på näringsagarn, då myceIet nått burkens sidovägg (Fig. 122). För varje temperatur infekterades med varje svampbiotyp fem burkar med klöverblad och dessutom fem petriskålar endast innehållande normal näringsagar. Bladstjälkarnas längd var så avpassad, att den lineära myceltillväxten innan sklerotiebildning inträffade blev ungefär lika lång (cirka 45 mm.) i både klöverproven och de rena näringsagarproven. Luftfuktigheten var i samtliga försöksled praktiskt taget 100 %. De temperaturer, vid vilka myceIutvecklingen bestämdes var 5±2°, 10±2°, 15±2°, 20±2° och 25±0°. De fyra förstnämnda temperaturerna erhöllos i skilda växthuskammare; den sistnämnda i en termostat med glasdörr. Vid 25° kunde på grund av oregelbunden och abnormt tidig sklerotiebildning — redan på övre delen av bladstjälkarna och i agarplattorna innan mycelet hunnit växa ut till kanten — inga tillförlitliga mätningar utföras, varför detta försöksled slopades. Det framgick emellertid tydligt, att vid denna temperatur myceltillväxten såväl på klöver som på näringsagar skedde långsammare än vid 15° och 20°.

Parallellt med klöverblads- och agarympningarna utfördes vid de fyra lägre temperaturerna såsom kontroller likartade bladinfektioner på i krukor planterade individ tillhörande samma rödklöverklon (K 22) med en av de i försöket ingående *Sclerotinia*biotyperna (Sval 6-44). Mycelets utbredning på dessa kontroller överensstämde i samtliga försöksled väl med infektionerna på bladen i agarburkarna. Detta gällde såväl de nekrotiska förändringarna som utvecklingshastigheten, varför man kan antaga, att inga väsentliga, på försökets förlopp störande, förändringar i de avklippta rödklöverbladens vitalitet inträffade. — Oinfekterade, avklippta klöverblad i samma slags näringsagarburkar ingingo även i försöket. Flera av dessa blad voro, då sklerotiebildning inträffat i de infekterade försöksleden, till det yttre fullständigt friska. Inga av kontrollbladen företedde vanliga nedvissningssymptom, men några antydde genom abnormt mörkgrön blodfärg, att vissa förändringar i den normala ämnesomsättningen skett. Det synes mig dock icke sannolikt, att dessa förändringar voro av så genomgripande art, att de i väsentlig grad kunnat påverka mycelväxten; i varje fall ej så mycket att optima på de i figurerna 123 och 124 återgivna klöverkurvorna i verkligheten (icke avklippta blad) skulle ha legat vid en helt annan temperatur. Såsom tidigare påpekats var avsikten med detta försök endast att söka påvisa, om optima i kultur och på värdväxten äro mycket tydligt skilda eller ej.

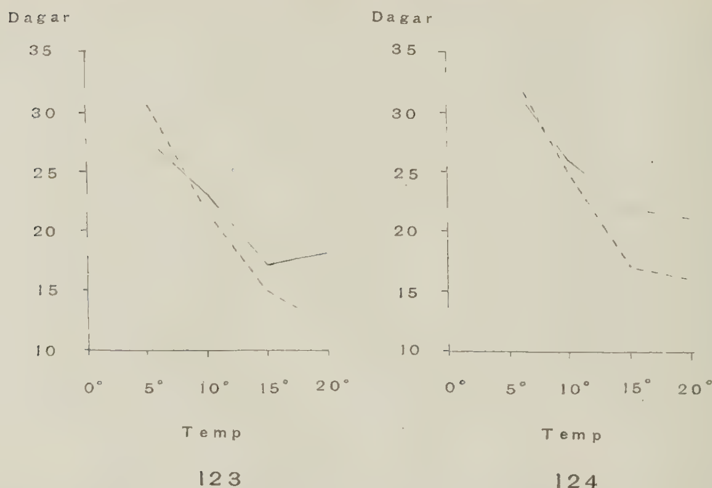


Fig. 123, 124. Diagram över tiden för två Sclerotiniabiotypers sklerotiebildning vid olika temperaturer. 123 Sval 6—44 på klöverklon K22 ——— och på näringsagar — — —. 124 Sved 4—1 på klöverklon K22 ——— och på näringsagar — — —.

Diagramm über die Zeit für die Sclerotienbildung von zwei Sclerotiniabiotypen bei verschiedener Temperatur. 123 Sval 6—44 auf Kleeklon K22 ——— und auf Nahrungsagar — — —. 124 Sved 4—1 auf Kleeklon K22 ——— und auf Nahrungsagar — — —.

Ovanstående diagram ha konstruerats med värden, som för varje temperatur representera ett medeltal av fem observationer. Medeltalen inom varje kurva voro statistiskt mycket säkert skilda. Av dessa diagram framgår, att temperaturoptimum för mycelets utveckling på klöver ligger betydligt högre än det temperaturområde, vid vilket man i naturen finner den kraftigaste mycelutvecklingen. Med stöd av kurvorna jämte den ovan omtalade observationen, att utvecklingen var långsammare vid 25° än vid 15° och 20° kan man antaga, att optimum för tillväxten på klöver i detta försök låg mellan 15° och 20°, alltså ungefär på samma ställe eller möjligen något lägre än optimum för myceltillväxten i kultur.

Samtliga blad till burkinfektionerna i detta försök avklipptes från en viss planta tillhörande klonen K 22, och denna planta hade under en månads tid före avklippningen av bladen stått i växthus vid cirka 15°. Detta förhållande gav anledning till ytterligare ett mindre kontrollförsök i syfte att utröna, huruvida olika behandling av värdväxten före infektionen i någon väsentlig grad kunde påverka utseendet av de i figur 123, 124 återgivna kurvorna. Som utgångsmaterial användes två likgamla och likstora plantor ur samma rödklöverklon (K 22), som i huvudförsöket, vilka nedklipptes och placerades under oktober månad den ena i växthus vid cirka 15°, den andra i det fria. Medeltemperaturen utomhus var under denna månad

7.2° och fem frostnätter förekommo. I slutet av månaden avklipptes från vardera plantan fem blad, som infekterades på samma sätt, som i föregående försök. Endast en av svampbiotyperna (Sval 6-44) kom till användning. Samtliga tio infekterade blad placerades i en växthuskammare vid en temperatur av 9±2°. Nekrosbildning, mycelväxt och sklerotiebildning förlöpte så gott som lika i båda försöksleden. I bladen, som härstammade från plantan i det fria, var dock utvecklingen mera ojämn, vilket framgår av det högre medelfelet på medeltiden för sklerotiebildningen. Medeltiderna voro för förbehandling 15°: 24.6±0.26 dagar; för förbehandling 7.2°: 24.2±0.82 dagar. Av dessa tal framgår dels, att de båda försöksleden väl kunna infogas i klöverkurvan figur 123, dels att någon statistiskt säker skillnad mellan de olika förbehandlingarna av värdväxten ej föreligger. Enligt min mening är detta förhållande ganska märkligt, då det är troligt, att vissa skillnader i de olikbehandlade bladens halt av för svampen begärliga näringsämnen förelågo åtminstone vid början av försöket. I första hand kan man då tänka på en ökning av mängden lösliga kolhydrater i bladen från plantan i det fria, som utstått fem frostnätter innan infektionen. Det är möjligt, att dessa antagna skillnader i bladen i kontrollförsöket snabbt utjämnades vid den ifrågavarande försökstemperaturen. Dessa teoretiska spekulationer äro av ringa värde, då inga försök angående kolhydratsammansättningen i klöverblad vid olika temperaturer kunna framdragas som stöd. Det förefaller emellertid ytterst sannolikt, att en verklig, om än ringa fenotypisk skillnad måste föreligga i resistensen mellan vid olika temperaturer förbehandlade blad. Denna skillnad synes dock icke vara så stor, att den i någon nämnvärd grad kan påverka läget av det verkliga temperaturoptimum för myceltillväxten på klöver, vilket följaktligen kan anses ligga ungefär på samma ställe som kulturoptimum.

Att så verkligen är fallet, styrkes vidare av erfarenheterna från några större infektionsförsök, som jag utfört i drivbänkar under sommarmånaderna vid temperaturer omkring 15° och hög luftfuktighet. Mycelutvecklingen var i dessa försök betydligt kraftigare och snabbare än i ett liknande försök som utfördes under vintern 1939—40.

Klöverrötan kan således icke inrangeras i *Gibberella-Thielavia*gruppen, i vilken de båda ifrågavarande temperaturoptima äro mycket tydligt skilda. Av kurvornas förlopp i de båda diagrammen (Fig. 123, 124) framgår emellertid, att förhållandet mellan mycelutvecklingen på värdväxten och i kultur är olika vid olika temperaturer; vid 15° och 20° sker utvecklingen på värdväxten långsammare än i kultur; vid 5° är förhållandet omvänt. Detta tyder på en termiskt betingad depression av värdväxtens resistens av i princip liknande slag, som antages råda inom *Gibberella-Thielavia*gruppen. För värdparasitkomplexet rödklöver-*Sclerotinia trifoliorum* — eller rättare sagt den i försöket använda rödklöverklonen och de båda ifrågakommande *Scle-*

*rotinia*biotyperna — synes emellertid värdväxtens resistens vid den för svampen kulturoptimala temperaturen icke vara tillräckligt stor för att i sådan grad hejda mycelutvecklingen, att tvenne tydligt skilda temperaturoptima bildas, ett lägre för tillväxten på värdplantan och ett högre för tillväxten på steriliserade substrat.

Att svampens kraftigaste utbredning i naturen sker vid så avsevärt lägre temperatur än den optimala torde bero på flera samverkande omständigheter. Den rikligare förekomsten av infektionsmaterial (apotheciebildningen är rikligast under höstmånaderna) och framför allt den högre relativa luftfuktigheten vid dessa låga temperaturer synas vara de viktigaste av dessa faktorer. Utmärkande för de svåraste vinterangreppen är nämligen, att svampen genom kraftig, huvudsakligen extramatrikal växt och kontaktinfektioner snabbt sprider sig från planta till planta. Den yttre förutsättningen för utvecklingen av de karakteristiska, mot luften fritt exponerade mycelmattorna i klöverfälten under vintermånaderna synes mig vara tillräckligt hög luftfuktighet icke blott nere i själva klöverbeståndet utan även ovanför detsamma.

I ovanstående diskussion har använts uttrycket tillräckligt hög luftfuktighet utan att denna siffermässigt angivits. I flera tidigare arbeten om klöverrötan har också luftfuktighetens betydelse m. e. m. starkt poängterats, dock utan stöd av kontrollerade försök. Så påpeka t. ex. Gilbert och Bennet (1917), att myceltillväxten på klöver fullständigt stoppas »by cutting down the water supply» (l. c. p. 439). Nilsson-Leissner och Sylvén (1927) framhålla, i samband med påvisandet av de milda vintrarnas befrämjande inverkan på sjukdomsangreppen, förutom temperaturen, luftfuktighetens betydelse och anföra även siffror. »Den månatliga medelluftfuktigheten kl. 8 f. m. har nästan undantagslöst varit över 90 % och kl. 2 e. m. endast mycket sällan varit under 75 %» (l. c. p. 139).

För att få en närmare uppfattning om luftfuktighetens inverkan utförde jag ett växthusförsök med mycelinfektioner på en del krukplantor av en annan rödklöverklon (K 23) med i princip samma metod som i ovanstående temperaturförsök. På varje planta gjordes tre bladinfektioner. Försöket omfattade fyra led i skilda växthuskammare, i vilka luftfuktigheten genom olikartad bevattning av koksfyllda zinkbehållare varierades. I ett av försöksleden stod den infekterade klöverplantan hela tiden under en glaskupa, och vattning skedde dagligen underifrån, så att luftfuktigheten praktiskt taget var 100 %. Plantorna i de tre övriga försöksleden fingo de fyra första dagarna också stå under glaskupor vid 100 % fuktighet, varefter de, sedan tydlig myceltillväxt konstaterats från ympställena på bladen, utflyttades i skilda växthuskamrar, i vilka temperatur och fuktighet registrera-

Tabell 4. *Luftfuktighetens inverkan på mycelets tillväxt.*

Einwirkung der Luftfeuchtigkeit auf das Wachstum des Myzels.

Luftfuktighet % Luftfeuchtigkeit %	Sjukdomsbild efter 22. dagen. Krankheitsbild nach dem 22. Tage.
100	Mycket kraftig extra- och intramatrikal mycelväxt. Samtliga 36 blad på plantan angripna. Sehr kräftiges Myzelwachstum, extra- und intramatrikal. Sämtliche 36 Blätter der Pflanze angegriffen.
89—95	Kraftig extra- och intramatrikal mycelväxt. 11 av de 39 bladen på plantan angripna. Kräftiges extra- und intramatrikales Wachsen des Myzels. 11 der 39 Blätter der Pflanze angegriffen.
70—90	Ingen extra- och endast obetydlig intramatrikal mycelväxt, inskränkt till de infekterade delbladen, vilka voro helt nekrotiska. Sidoblad friska. Kein extra- und nur unbedeutendes intramatrikales Wachsen des Myzels, eingeschränkt auf die infektierten Teilblätter, welche ganz nekrotisch waren. Seitenblätter gesund.
60—80	Ingen ytterligare mycelväxt efter förbehandlingen vid 100 % fuktighet. Partier av de infekterade delbladen ännu gröna. Kein weiteres Wachsen des Myzels nach der Vorbehandlung bei 100 % Feuchtigkeit. Teile der infektierten Teilblätter noch grün.

des med termohygrografer. Temperaturen varierade mellan 9° och 15° men höll sig övervägande delen av tiden vid 11°. Försöket avslutades efter 22 dagar. Resultatet framgår av tabell 4.

Med ledning av försöksresultatet kan man icke exakt angiva under vilken luftfuktighet mycelväxten helt avstannar, men det framgår dock klart, att fuktighetsprocenten bör vara omkring 90 eller därutöver för att någon tillväxt av betydelse skall äga rum.

Det återstår nu att jämföra dessa laboratorievärden med värdena på luftfuktigheten under sådana månader, då temperaturen icke utgör en begränsande faktor för mycelets tillväxt. Vid en undersökning av möjligheterna att i siffror eller kurvor framställa luftfuktighetens årsvariation, visade det sig, att dessa möjligheter äro ganska begränsade. En allmän internationell formel för beräkning av månadens medeldygnluftfuktighet av samma art som formeln för beräkning av motsvarande temperaturvärde (Ekholm 1914) finnes visserligen men kan icke tillämpas på svenska förhållanden, enär ortskoefficienter saknas. För övrigt skulle dessa medelvärden vara ganska missvisande i synnerhet för sommarmånaderna, då dygnsvariationen är mycket stor. En viss uppfattning om fuktighetsförhållandena under olika månader kan dock erhållas ur den högsta och den lägsta av de tre dagliga bestämningar, som utföras vid olika meteorologiska stationer. I nedanstående diagram (Fig. 125) äro värdena aritmetiska medeltal av månadsmedeltalen under en tioårsperiod vid Lunds meteorologiska station.

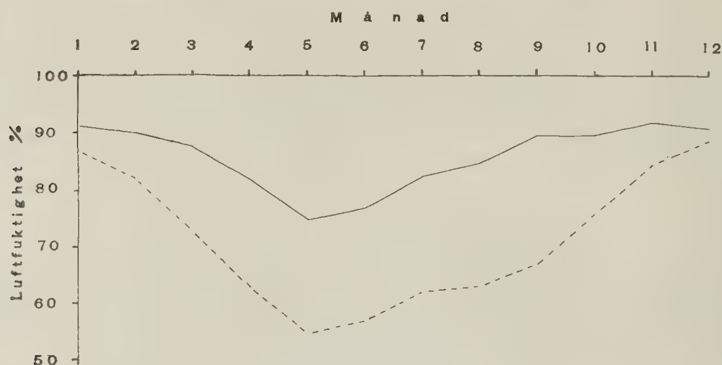


Fig. 125. Diagram över luftfuktigheten vid Lunds meteorologiska station under 10-årsperioden 1931—1940. ——— genomsnittliga tal ur högsta avlästa dygnsvärde, — — — genomsnittliga tal ur lägsta avlästa dygnsvärde.

Diagram über die Luftfeuchtigkeit in Lund (meteorologische Station) während der 10-Jahrperiode 1931—1940. ——— durchschnittliche Zahl aus dem höchsten abgelesenen 24-Stundenwert, — — — durchschnittliche Zahl aus dem niedrigsten abgelesenen 24-Stunden-Wert.

En jämförelse med dygnskurvorna från hygrografer visar dock, att de verkliga fuktighetsmaxima och minima under sommarmånaderna i regel ligga högre respektive lägre än i diagrammet figur 125, varför detta åtminstone för april—september måste bedömas med en viss försiktighet. Av diagrammet framgår dock att medelluftfuktigheten endast under tiden oktober—mars tillnärmelsevis uppgår till sådana värden, vid vilka någon mycelväxt av betydelse kan ske. Det må dock framhållas, att dessa värden äro medeltal, och att luftfuktigheten ofta är högre t. ex. vid dimma, som under vintermånaderna ej så sällan råder under flera sammanhängande dygn. Under tiden december—februari är i regel temperaturen begränsande faktor för mycelets tillväxt.

Det för *Sclerotinia trifoliorum* kännetecknande starka beroendet av luftfuktigheten torde sammanhänga med det sätt, varpå svampen utvecklas på värdväxten, framför allt på bladen. Av en ännu icke avslutad undersökning rörande närmare detaljer i infektionsförloppet har bl. a. framgått, att tillväxten på bladen i samtliga hittills studerade fall (klöverklon-svampbiotyp) till övervägande delen sker extramatrikalt. I bladstjälkar och i stammen är förhållandet omvänt. En av förutsättningarna för kraftig extramatrikal växt, vilken även medför ökad infektionsrisk för omgivningen, är som ovan visats (Tab. 4) hög luftfuktighet.

Slutligen må det framhållas, att de i detta kapitel behandlade miljöfak-

torernas (temperaturens och luftfuktighetens) inflytande på mycelutvecklingen på och i värdväxten endast avse denna process' förlopp från och med ett stabilt parasitiskt (ev. pertofytiskt) tillstånd uppnåtts, d. v. s. närvaro av virulent mycel på bladen. Huru detta mycel utvecklas ur de obetydliga genom askosporer åstadkomna primärinfektionerna är en fråga, som tangerar en del av det egentliga resistensproblemet, och som jag därför icke skall ingå närmare på i detta arbete. Av de ovannämnda ännu icke avslutade försöken härom framgår emellertid, att även för detta tidiga avsnitt i sjukdomsförloppet, hög luftfuktighet är en av de nödvändiga förutsättningarna.

VI. Modifikativ variation.

Föregående undersökningar. Jämförande försök angående den modifikativa variationsbredden i kultur hos *S. trifoliorum* ha utförts av Pape (1937). Försöksmaterialet utgjordes av vegetativa förökningar av olika stammar, vilka odlades på näringsagar under avsiktligt varierade miljöförhållanden. På så sätt undersöktes ingående de av skillnader i substratets näringsförhållanden och pH samt av temperaturen och kolsyrehalten orsakade modifikativa variationerna. Dessa försök ha i vissa avseenden kompletterats av Nicolaisen et al. (1940), vilka arbetat med ensporkulturer av svampen och konstaterat substratmängdens avsevärda, modifikativa inflytande på kulturernas utseende. Liknande försök som de ovannämnda av Pape ha utförts med ett flertal andra parasitiska svampar (Fischer-Gäumann 1929, Roehmer, Fuchs, Isenbeck 1938).

Egna undersökningar. För att få en närmare uppfattning om modifikationsbredden i kultur under så vitt möjligt likartade miljöförhållanden utförde jag under 1939 och 1940 några metodologiska kulturförsök med ett par morfologiskt olika biotyper. Med tanke på en eventuell, på skillnader i morfologiska kulturkaraktärer grundad rasanalys, ansågs det nämligen önskvärt att kontrollera om m. e. m. ofrivilligt orsakade variationer i substratet eller ympmaterialet under i övrigt lika yttre miljöförhållanden kunde i märkbar grad påverka kulturernas tillväxt och utseende. Försöken, som utfördes vid rumstemperatur med genetiskt enhetligt material (vegetativa förökningar av biotyper) på samma substrat (normal näringsagar i petriskålar), avsågo att belysa eventuella modifikativa inflytelser av substratets mängd och ålder, samt ympmaterialets mängd och ålder. Beträffande substratmängdens inflytande ha, som ovan nämnts, försök nyligen utförts av Nicolaisen et al. Mitt försök rörande denna fråga utfördes, innan jag hade kännedom härom, och då mina resultat bekräfta dessa publicerade försök av Nicolaisen et al., har behandlingen av denna del av den modifikativa variationen kunnat göras kortfattad. Även ifråga om ympmaterialets ålder ha Nicolaisen et al. gjort flera iakttagelser, med vilka

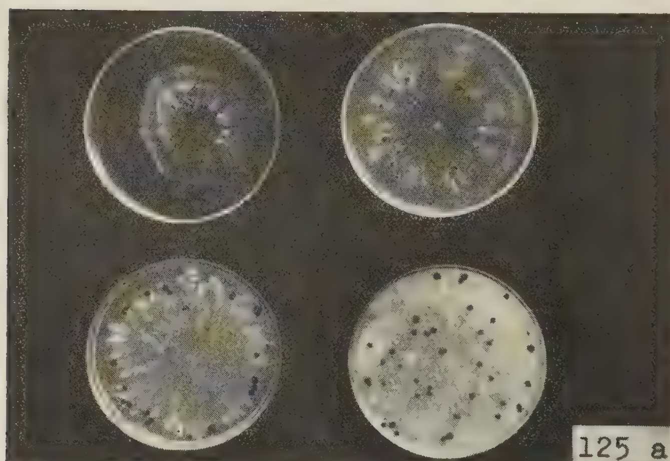


Fig. 125 a. Substratmängdens inverkan.
Övre raden till vänster 1 mm. till höger 2 mm.
Nedre » » » 4 » » » 8 » skikttjocklek. Biotyp Sval 6—44.

Der Einfluss der Substratmenge.
Obere Reihe links 1 mm. rechts 2 mm.
Untere » » 4 » » 8 » Schichtdicke. Biotyp Sval 6—44.

resultaten från mina försök överensstämma (se nedan ympmaterialets ålder).

Substratmängden. Två försöksserier omfattade biotyperna Sval 6-44 och Sved 4-1 på agarplattor med 1, 2, 4 och 8 mm. skikttjocklek hos substratet. Ympmaterialet bestod av likstora agarkuber (cirka 3 mm. sida) innehållande mycelspetsar, utskurna från kanten av i tillväxt varande kulturer. Med vardera biotypen ympades fem plattor av varje skikttjocklek. Variationen i tillväxthastighet och kulturernas allmänna utseende inom varje försöksled var mycket obetydlig, vilket för övrigt i allmänhet konstaterades vid mycelympningar av denna typ (Fig. 137). Mindre olikheter i myceltäthet och förgrening samt sklerotiernas inbördes placering kunna förorsakes av rena tillfälligheter såsom luftblåsor i agarn, smärre vätskedroppar på agarytan m. m. Mellan de olika försöksleden (= skikttjocklekarna) var variationen ifråga om sklerotiernas inbördes placering och antal däremot avsevärd. Särskilt märkbart framträdde detta hos biotypen Sval 6-44, där fyra olika »morfotyper», en för varje skikttjocklek erhöllos (Fig. 125 a). Skillnaden mellan de två högsta substratmängderna (tjocklek 4 och 8 mm.) var mest iögonfallande och bestod i att ungefär dubbelt så många och över hela plattan spridda sklerotier bildades på det tjockare substratet. Dessa resultat bekräfta till fullo de ovannämnda av NICOLAISEN et al.

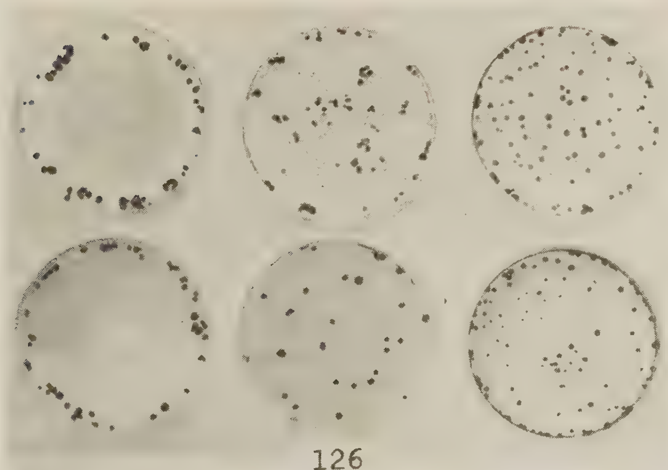


Fig. 126. Modifikativ inverkan av ympmaterialets mängd. De två vänstra plattorna ympade med 1 spor, de mittersta med 10 och de högra med cirka 1000 sporer av samma biotyp (W 6—1).

Modifikative Einwirkung der Menge des Imfungsmaterials. Die zwei linken Platten geimpft mit 1 Spore, die mittleren mit 10 und die rechten mit cirka 1000 Sporen desselben Biotyps (W 6—1).

Beträffande de tunnare skikttjocklekarna (1 och 2 mm.), där ett mindre antal sklerotier bildades, måste man sannolikt räkna med under försökets förlopp förändrade fuktighetsbetingelser — i form av en viss uttorkning av substratet — såsom bidragande orsak till avvikelserna i kulturutseendet. Då försöket emellertid endast omfattade 14 dagar — och det under denna tid enligt nedan relaterade försök icke inträffade några på tillväxten märkbart inverkande förändringar i substratets fuktighetsförhållanden vid en tjocklek av 4 mm. eller därutöver — måste skillnaderna i kulturutseendet mellan de båda övriga skikttjocklekarna (4 och 8 mm.) bero på andra orsaker, förmodligen på det inbördes förhållandet mellan på ytan och i själva agarn växande mycelmängder.

Substratets ålder. Två försöksserier ympades på samma sätt och med samma material som i föregående försök. Skikttjockleken var 4 mm. Substratets ålder var i de olika försöksleden 80, 15, 10, 5, 3, 2, 1 dagar samt för dagen färskt substrat. Såväl inom som mellan samtliga försöksled utom det förstnämnda (80 dagar gammal agar) var variationen ifråga om kulturernas utseende mycket obetydlig. Det var sålunda icke möjligt att se skillnader mellan kulturer på substrat av olika ålder. Den genomsnittliga tillväxthastigheten under de första tio dagarna var dock något större (cirka 10 %) i försöksledet med den helt färska agarn, något som dock icke på-

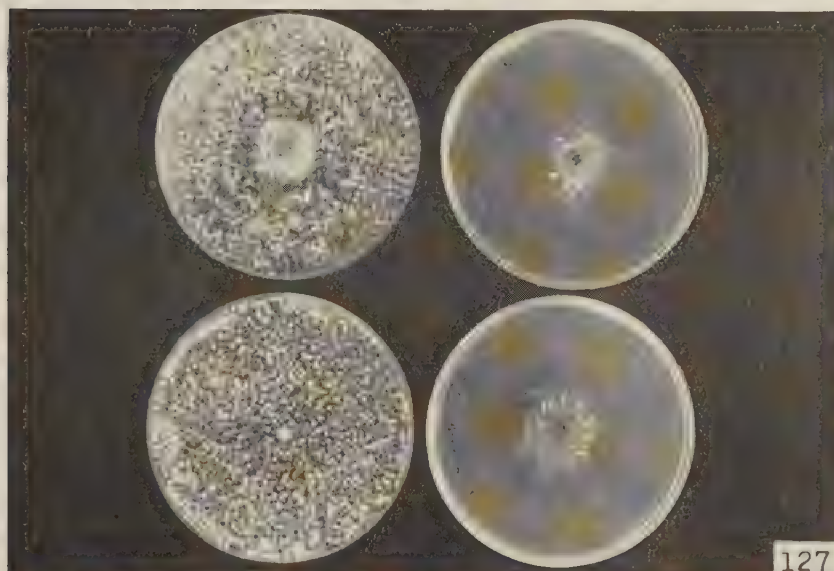
verkade det slutliga kulturutseendet, vilket väl överensstämde med försöksleden med 1—15 dagar gammalt substrat. På den 80 dagar gamla agarn var tillväxthastigheten avsevärt mindre och varierade liksom det slutliga kulturutseendet inom själva försöksledet. Substratet var i detta led påfallande mycket torrare och segare än i övriga, varför förändringar i såväl fuktigheten, substratets konsistens som näringskoncentration kunde tillskrivas inflytande på myceltillväxten.

Ympmaterialets mängd. Antalet ympade askosporer per agarplatta inverkade väsentligt på kulturernas slutgiltiga utseende såväl beträffande sklerotiernas inbördes placering som deras storlek och antal (Fig. 126). Vid ympning med en askospor erhölls i regel samma utseende som vid ympning med ett stycke agar innehållande i tillväxt varande mycel. Flera askosporer på samma platta åstadkommo en mera spridd fördelning med flera men mindre sklerotier. Den ökade mikrokonidiebildningen vid ympning med genetiskt enhetligt askospormaterial i mycket stora mängder per ytenhet substrat har tidigare omtalats (sid. 65).

Stora variationer i kulturernas utseende förekommo i vissa fall även vid vegetativa mycelförökningar. Vid ympning av ett antal plattor med stora ympbitar (½—1 cm²) från det inre av färdiga, även relativt unga moderkulturer uppträdde i ett varierande antal fall bland de utväxande dotterkulturerna avvikande typer med långsammare och ofta till en à ett par cm. begränsad tillväxt. (Fig. 127). Dylika avvikelser inträffade icke, då ympmaterialet bestod av mindre agarbitar, eller om det var taget från kanten av tillväxande kulturer. Jämförande mikroskopiska undersökningar gåvo vid handen, att antalet hyfer per ytenhet substrat var avsevärt större hos kulturerna med hämmad tillväxt än hos de normalt växande. Tillväxthämningen i de avvikande kulturerna var påtagligt modifikativ och syntes endast bero på en alltför riklig anhopning av ämnesomsättningsprodukter bl. a. oxalsyra i substratet framför de perifera hyfspetsarna. I en zon i agarn omedelbart utanför randen av de långsamväxande kulturerna bildades nämligen genom det kompakta mycelets verksamhet en tät barriär av oxalatkristaller (Fig. 129). Ehuru detta icke i och för sig bevisar, att hämningen av myceltillväxten uteslutande berodde på denna oxalatbarriär, så

Fig. 127—129. Modifikativ inverkan av ympmaterialets beskaffenhet. 127 Samtliga fyra plattor lika gamla (18 dagar); de två vänstra normalt utvecklade; de två högra hämmade. 128 Mikrofoto från kanten av en normalt växande kultur. Inga oxalatkristaller. 129 Från kanten av en hämmad kultur. Många oxalatkristaller. Samtliga foto från biotyp Sved 4—1.

Modifikative Einwirkung der Beschaffenheit des Impfungsmaterials. 127 Sämtliche vier Platten gleich alt (12 Tage); die zwei linken normal entwickelt; die zwei rechten gehemmt. 128 Mikrophoto der Kante einer normal wachsenden Kultur. Keine Oxalatkristalle. 129 Mikrophoto der Kante einer gehemmten Kultur. Viele Oxalatkristalle. Sämtliche Photographien vom Biotyp Sved 4—1.



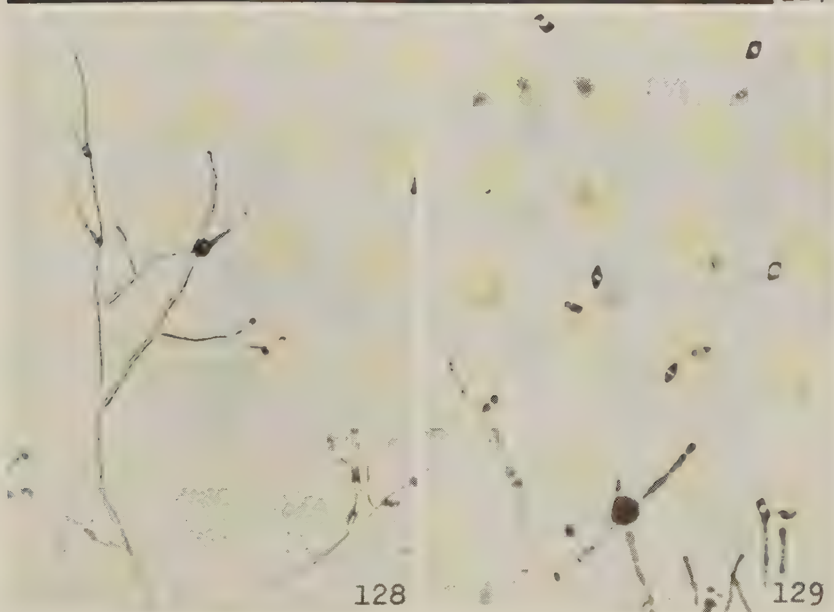


Fig. 127—129 (se föreg. sida).

indikerar i varje fall den rikliga oxalsyrebildningen en avsevärd utsöndring av ämnesomsättningsprodukter i agarn framför hyfspetsarna. I normala kulturer (Fig. 128) voro hyferna glesare samt oxalatbildningen per ytenhet betydligt mindre och röjde sig endast genom förekomsten av enstaka kristaller. Att tillväxthämningen i detta fall var av uteslutande modifikativ karaktär framgick vidare därav, att vegetativa förökningar med små ympbitar från de avvikande kulturerna på nytt substrat gåvo fullt normala med ursprungsbiotypen överensstämmande kulturer. I en del fall bildades även direkt i de hämmade kulturerna normalt växande sektorer, därigenom att enstaka hyfer genombröto oxalatbarriären och utvecklade sig solfjäderformigt utanför denna. Mycelförökningar av dessa sektorer gåvo också normala kulturer. Även reaktionstypen ifråga om bildning av demarkationslinjer med andra biotyper (sid. 98) var hos dessa kulturer densamma som ursprungsbiotypens. Dessa utbrytande, i förhållande till övriga delar av de hämmade kulturerna mera snabbväxande mycel voro sålunda enligt den i kapitel VII, 1 uppställda arbetshypotesen fullt normala och till genotypen oförändrade. Följaktligen voro dessa relativt sett snabbväxande mycel icke av samma natur, som de till fenotypen likartade snabbväxande kultursektorer hos *Venturia pirina,* vilka nyligen beskrivits av KEITT och LANGFORD (1940) som verkliga mutationer.

Ympmaterialets ålder. Ett par försöksserier med sammanlagt 24 försöksled med 5 plattor i varje led omfattande två biotyper utfördes på normal näringsagar. Ympmaterialet bestod dels av mycel från agarkulturer i åldrarna: 0, 7, 12, 25, 32, 44 och 90 dagar, dels av sklerotier i åldrarna: 15, 22, 34, 80 och 360 dagar. Av försöket framgick, att samtliga kulturer inom varje biotyp — på två undantag när — voro så gott som fullständigt morfologiskt enhetliga såväl inom som mellan de olika åldersgrupperna. I de försöksled där ympmaterialet bestod av yngre mycel (0—12 dagar) åtgick det visserligen något kortare tid för fullständig myceltäckning av plattan och sklerotiebildning. Detta berodde emellertid icke på större tillväxthastighet hos mycelet i dessa kulturer, utan på det förhållandet att tillväxten i de med äldre mycel ympade plattorna igångsattes senare. Av samma anledning tog utvecklingen av kulturerna på de med sklerotier ympade plattorna 2 à 3 dagar längre tid än motsvarande mycelympningar.

Två av de med äldre mycel (25 dagar respektive 90 dagar) ympade kulturerna, båda tillhörande biotypen Sved 4-1, voro till utseendet mycket avvikande från de övriga kulturerna inom biotypen. Båda plattorna hade ungefär samma avvikande utseende, men endast den ena blev föremål för närmare undersökning. I denna var sklerotiebildningen endast i en relativt smal sektor normal; på övriga delar av plattan bildades inga sklerotier utan endast mycel jämte mikrokonidier i stort antal (Fig. 130). Denna biotyps normala kulturutseende framgår av de två vänstra plattorna i figur



Fig. 130, 131. Plattan 130 ympad med 25 dagar gammalt mycel. Endast en smal sektor har det för biotypen normala kulturutseendet med sklerotier. 131 Subkulturer ur 130. De två vänstra ympade med mycel från den normala sektorn; de två mittersta med sklerotier också från den normala sektorn, de två högra med mycel från övriga delar av plattan 130. Samtliga foto från biotyp Sved 4—1.

Platte 130 geimpft mit 25 Tage altem Myzel. Nur ein schmaler Sektor hat das für die Biotype normale Kulturaussehen mit Sclerotien. 131 Subkulturen aus 130. Die zwei linken geimpft mit Myzel von dem normalen Sektor; die zwei mittleren mit Sclerotien ebenfalls von dem normalen Sektor; die zwei rechten mit Myzel von übrigen Teilen der Platte 130. Sämtliche Photographien vom Biotyp Sved 4—1.

127. Tillväxthastigheten var lika stor såväl i sektorn som i övriga delar av plattan. Utseendet på några vegetativa förökningar från denna kultur framgår av figur 131. De båda vänstra plattorna äro ympade med mycel från den normala sektorn, de två mittersta med sklerotier också från den normala sektorn och de båda högra med mycel från den övriga delen av plattan. Ytterligare förökningar med sklerotier från de vänstra plattorna i figur 131 gåvo dels fullt normala kulturer, dels sektorbildande. Ympningar från de högra plattorna gåvo i åtta ytterligare klongenerationer på samma substrat endast kulturer utan sklerotiebildning. Att det trots denna vegetativa konstans i detta fall sannolikt var frågan om en modifikativ förändring antydes därav, att mycelympningar från de icke sklerotiebildande partierna i kulturen figur 130 på annat substrat (bröd + katrinplommondekokt) i några fall resulterade i normala, sklerotiebildande kulturer. Av fem subkulturer på bröd voro nämligen tre icke sklerotiebildande, under det att enstaka sklerotier bildades i de två övriga. Ytterligare subkulturer ympade med dessa sklerotier hade såväl på bröd som på vanlig näringsagar det för biotypen normala kulturutseendet. Fortsatta förökningar med mycel från de icke sklerotiebildande brödkulturerna på samma substrat förändrade icke deras kulturutseende; liksom hos motsvarande agarförökningar var sklerotiebildningen fullständigt försvunnen.

Orsaken till denna undertryckning av sklerotie- och samtidiga ökning av mikrokonidiebildningen hos dessa avvikande mycel har jag icke kunnat fastställa. Om det är frågan om en verklig mutation i kärnornas arvsmassa, vilket icke förefaller troligt, skulle egenskapen vara ärftlig och således efter den sexuella reproduktionen åter uppträda i sporavkomman från apothecier, bildade från dessa mycel. Då sklerotier saknas är möjligheten att erhålla apothecier utesluten. Jag utförde därför några korsningsförsök med dessa mycel och normala sklerotiebildande mycel från en annan självfertil biotyp (Sval 17-1) enligt det på sidan 110 beskrivna förfaringssättet. Tre apothecier ur sklerotier från korsningskulturen analyserades (förfaringssätt se sid. 103) och befunnos samtliga vara homokaryotiska och tillhörande den normala sklerotiebildande biotypen (Sval 17-1). Av detta negativa försök kan alltså inga slutsatser dragas om mutation eller modifikation föreligger. Trots den vegetativa konstansen hos dessa mycelavvikelser är jag dock mest benägen för att tillsvidare betrakta dem som fast inducerade modifikationer, vilka uppkommit genom en med åldern inträdande förändring i mycelets normala fysiologi.

Denna företeelse — förlust av förmågan att bilda sklerotier — uppträdde även i några av *Sclerotinia*stammarna, sedan dessa varit i odling och förökats vegetativt i kulturrör under 1—2 år. Åtskilliga försök att återställa sklerotiebildningsförmågan hos dessa stammar genom att odla dem på en del andra substrat, bl. a. levande klöverplantor, misslyckades. En av stammarna gjorde svaga ansatser till sklerotiebildning i form av vita luftmycelknutar i synnerhet på normal näringsagar med tillsats av cellulosa (i form av finfördelat filtrerpapper), men dessa anlag utvecklades icke till mogna sklerotier. — Till slut bör det påpekas, att denna förlust av förmågan att bilda sklerotier icke synes vara förenad med någon inskränkning i mycelets övriga vegetativa växt. Sålunda förekommo endast obetydliga skillnader i mycelets tillväxthastighet mellan den normala biotypen i det ovan relaterade försöket och dess icke sklerotiebildande vegetativa avkomling. Dessa mycelavvikelser voro vidare såväl till uppkomst som till utseende klart skilda från de med steriliteten hos vissa sporavkommor korrelerade degenerationsfenomen (Kap. II, 3).

I sina omfattande undersökningar av *Sclerotinia trifoliorum* ha Nicolaisen et al., som förut påpekats, iakttagit liknande förluster av sklerotiebildningsförmågan såväl i stammar i kulturrör som i näringsagarplattor, vilka ympats med 4 månaders gammalt sklerotiemjöl. Nicolaisen et al. ha även utfört försök att återställa sklerotiebildningsförmågan, vilka emellertid hittills icke givit några entydiga resultat. Dessa iakttagelser jämte de ovan relaterade försöksresultaten i mitt *Sclerotinia*material visa, att företeelsen är ganska vanlig och förtjänar en viss uppmärksamhet. Det vore av intresse att konstatera, om dylika avvikelser även förekomma

i naturen, då detta bör innebära en förlust av icke blott sklerotiebildningsförmågan utan även den sexuella reproduktionsförmågan.

En del av ovanstående metodologiska undersökningar bekräfta, andra utvidga de tidigare av NICOLAISEN et al. framförda synpunkterna på substratets och ympmaterialets inflytande på kulturutseendet. Dessa iakttagelser jämte övriga av PAPE och NICOLAISEN et al. angående en del andra faktorers modifierande inflytande visa, att ett noggrant aktgivande på samtliga kontrollerbara miljöfaktorer avsevärt kan inskränka den modifikativa variationsbredden i kultur.

Modifikativ variation hos apothecierna. Ljusets formbildande inflytande har tidigare berörts (sid. 14). Något direkt samband mellan storleken hos sklerotierna och de ur dem utväxande apothecierna synes icke föreligga. Små sklerotier — av en ärts storlek — bilda ofta enstaka stora apothecier (cirka 7 mm. skåldiameter) och från stora sklerotier — av en valnöts storlek — utväxa ibland många små apothecier. Däremot utövar det substrat, på vilket sklerotierna bildats, ett tydligt modifierande inflytande på vissa fruktkroppskaraktärer. Följande försök illustrerar detta förhållande. Två *Sclerotinia*biotyper (Sval 6-44 och Sved 4-1) odlades samtidigt genom mycelympningar på klöver (likstora plantor ur klonen K3), på bröd och på vanlig näringsagar. Sklerotiebildning uteblev på klöver med den ena biotypen (Sved 4-1) trots att plantornas ovanjordiska stam och stjälkdelar fullständigt genomvävts av mycel. Detta förhållande bekräftade tidigare iakttagelser, att vissa svamp-klöverklonkombinationer icke resultera i sklerotiebildning (BJÖRLING 1939). Av biotypen Sval 6-44 erhölls sklerotier, av vilka 50 ungefär likstora från varje substrat utlades till groning under samma miljöbetingelser. Apothecierna som bildades med några dagars mellanrum (september 1941) hade väsentligt olika utseende i de olika försöksleden. Hos de från klöver och bröd härstammande var apothecieskålens genomsnittliga diameter ungefär lika stor men cirka 75 % större än skåldiametern hos de från näringsagar härstammande apothecierna (enligt approximativa mätningar på 20 individ ur varje försöksled voro värdena klöver: 6.0, bröd: 6.0, agar: 3.5 mm.). Några noggrannare mätningar av dessa modifikationer utförde jag icke, då dessa iakttagelser endast bekräfta tidigare av KEAY (1939) publicerade likartade resultat med den *S. trifoliorum* närstående arten *S. serica* Keay. Apothecierna i mina kulturer från klöver och bröd föreföllo även vara starkare färgade än de från näringsagar, men skillnaderna voro obetydliga.

Spormätningar på 10 sporer från 10 apothecier ur vardera ledet utfördes. Skillnaderna i längd/breddindex mellan de olika försöksleden voro obetydliga och statistiskt osäkra. Ej heller förelåg någon säker skillnad mellan sporstorleken (uttryckt i sporlängd) från stora och små apothecier inom samma försöksled. Medeltalet på sporlängden från 3 apothecier med 2 mm. skåldiameter var sålunda 12.49±0.20 μ och från 3 apothecier med 4 mm. skåldiameter 12.41±0.23 μ. En jämförelse mellan de olika försöksleden visade emellertid, att vissa skillnader i askosporlängd förelågo (Tab. 5).

Tabell 5. *Askosporlängd inom samma biotyp från olika substrat.*

Askosporenlänge innerhalb desselben Biotyps von verschiedenen Substraten.

Nr Nr	Substrat Substrat	Askosporlängd μ Askosporenlänge μ	Differens Differenz		D/m
			Nr Nr	Värde Wert	
1	Klöver Klee	14.07 ± 0.18	1—3	1.56	8.7
2	Bröd Brot	12.81 ± 0.18	1—2	1.26	7.0
3	Näringsagar Nährагar	12.51 ± 0.12	2—3	0.30	1.7

Av tabell 5 framgår att sporerna ur apothecierna från de på klöver odlade sklerotierna äro statistiskt säkert större än sporerna från de båda övriga försöksleden. Mellan de sistnämnda kunna inga säkra skillnader utläsas.

Dessa resultat, att sporerna från apothecier ur sklerotier, som bildats på värdväxten äro större än de sporer som bildas på konstgjorda substrat, synas vid första ögonkastet stå i motsatsförhållande till vissa uppgifter av Keay. Enligt Keays mätningar finnas nämligen inga statistiskt säkra skillnader mellan sporerna från apothecier av *S. minor* Jagger vare sig dessa härstamma från sklerotier odlade på steriliserade grönsaker (»vegetables» l. c. p. 238) eller på maltextrakt. Dessa Keays resultat äro dock enligt min mening icke fullt jämförbara med de ovan i tabell 5 anförda, åtminstone icke vad försöksledet med levande klöver beträffar, då de båda substrat på vilka *S. minor* odlats voro steriliserade, och det icke a priori kan förutsättas, att likvärdiga sklerotier bildas på levande och genom sterilisering dödade partier av värdväxten. För en annan *Sclerotinia*varietet, *S. trifoliorum* var. *Fabæ* Keay, angiver Keay för övrigt, att sporerna från ett apothecium ur ett direkt från värdväxten (*Vicia faba*) isolerat sklerotium voro signifikativt större än sporerna ur från konstgjorda substrat härstammande

apothecier inom samma varietet. Denna senare uppgift står i överensstämmelse med och bekräftas sålunda av mina försöksresultat hos huvudarten *S. trifoliorum*.

Vid mina ovannämnda spormätningar iakttogs en av metodiken orsakad ojämnhet i sporfördelningen, vilken kan vara av ett visst intresse att omnämna. De första mätningarna utfördes på sporer, som från horisontellt placerade apothecier kastats på täckglas. Den av sporerna belagda ytan på täckglaset bildade en m. e. m. långsträckt elliptisk figur med den kortända, från vilken sporerna kastats, tvärt avtrubbad. Mätningar inom olika partier av dessa sporytor visade, att större sporer i genomsnitt kastats längre bort från apotheciet än mindre. Följande exempel giver siffermässiga belägg för detta förhållande. I en av ett apothecium ur biotypen Sval 16-1 producerad sporyta mättes sammanlagt 100 sporer fördelade på två likstora partier (vardera cirka 4 mm^2) belägna på de ungefärliga avstånden av 8 respektive 2 mm. från det sporkastande apotheciet. Medelvärdet av sporlängden på det längre avståndet var $17.30 \pm 0.23\,\mu$; på det kortare avståndet $15.55 \pm 0.27\,\mu$. Kvoten differens genom gemensamt medelfel för dessa värden uppgår till 5.1, vilket visar, att det är frågan om två statistiskt säkert skilda sporpopulationer, vilka i detta fall härstamma från samma homokaryotiska apothecium. Förklaringen till att de större sporerna kastats längre, är sannolikt att söka i de vid denna försöksanordning rådande ballistiska förhållandena. Då de ballistiska grundvärdena i detta fall äro i huvudsak okända, kunna endast allmänna, tämligen osäkra antaganden göras. Det enklaste och närmast till hands liggande antagandet är, att trycket i de aski, från vilka de större sporerna härstamma, är större än det genomsnittliga, vilket bör åstadkomma en större utgångshastighet och därmed längre kastvidd hos dessa sporer. Även vid en genomsnittligt lika stor utgångshastighet från alla aski, är det emellertid ur ballistisk synpunkt förklarligt, att de större sporerna med sin relativt sett större belastning (vikt/tvärarea) kunna kastas längre än de övriga. Det är möjligt, att i verkligheten den längre kastvidden hos de större sporerna åstadkommes genom en samverkan mellan högre utgångshastighet och större belastning.

Ovannämnda olägenheter vid spormätningarna avhjälptes lätt därigenom, att apothecierna upphängdes i en ståltrådsgalge, från vilken sporerna kastades rakt nedåt på täckglaset, varvid en jämn sporfördelning erhölls.

VII. Av genotypiska skillnader betingad variation.

1. Allmänna iakttagelser.

Föregående undersökningar. Genom jämförande odlingar på näringsagar med 36 stammar av *S. trifoliorum* konstaterade PAPE (1937) vissa skillnader i mycelutveckling, sklerotieantal och fördelning på substratet samt appressoriebildning. En på dessa skillnader grundad klassificering av de olika stammarna kunde emellertid icke genomföras. Likaså erhöll POHJAKALLIO (1940) vid kulturförsök med *S. trifoliorum* en morfologiskt starkt avvikande myceltyp. Att denna avvikande myceltyp också var konstant efter sexuell reproduktion har emellertid icke påvisats.

PAPES undersökningar beträffande förekomsten av sannolikt genotypiska skillnader mellan olika stammar ha nyligen bekräftats och utvidgats av NICOLAISEN et al.

(1940), vilka med utgångspunkt från ensporkulturer dessutom påvisat, att olika myceltyper hålla sig konstanta även efter sexuell reproduktion i flera apotheciegenerationer. Skillnaderna mellan deras olika rena linjer hänföra sig till kulturernas växtbild (»Wuchsbild» l. c. p. 619), ej till tillväxthastighet och antal sklerotier per platta, då dessa egenskaper även inom genetiskt enhetligt material ansågs vara underkastat för stora variationer.

Förekomsten av i patogent avseende olika raser inom *S. trifoliorum* har tidigare gjorts sannolik (NILSSON-LEISSNER och SYLVÉN 1929, PAPE 1937). Att dylika fysiologiska raser finnas och bestå av genotypiskt skilda raser eller rasgrupper har vidare påvisats (BJÖRLING 1939).

Egna undersökningar. Resultaten från flera jämförande odlingsförsök på näringsagar med vegetativa förökningar av såväl 30 stammar från vitt skilda platser (Sverige, Danmark, U. S. A.) som ensporkulturer från dessa bekräftade PAPES tidigare resultat angående förekomsten av skillnader i mycelutveckling, sklerotiestorlek och antal samt appressoriebildning. Det allmänna intrycket av dessa försök var dock, att dessa morfologiska skillnader — med undantag av ett par i det följande närmare behandlade fall — i allmänhet voro obetydliga och framför allt svårdefinierbara. Någon på exakta mätningar grundad indelning var sålunda icke genomförbar.

Genom jämförande odlingar av ensporkulturer ur 2. och 3. apotheciegenerationen inom fyra olika rena linjer kunde jag även till fullo bekräfta de ovannämnda resultaten av NICOLAISEN et al. angående vissa myceltypers konstans. Samma svårigheter som vid försöken med stammar upprepade sig dock i dessa fall, när det gällde att tydligt definiera skillnaderna mellan typerna. Användandet av denna, enbart på tillväxtbilden grundade metod för att få en tillförlitlig uppfattning om den genotypiskt betingade variationen inom arten synes mig alltså osäkert och begränsat.

Vad som enligt min mening framförallt utesluter möjligheten till en detaljerad, endast på tillväxtbilden baserad biotypanalys är det förhållandet, att mellan åtskilliga, enligt andra försök fysiologiskt olika biotyper i mitt material, icke några tydliga skillnader vare sig i tillväxthastighet eller i morfologiska egenskaper hos de utväxta kulturerna förekommo. Sålunda överensstämde exempelvis tre i tidigare infektionsförsök (BJÖRLING 1939) prövade stammar i samtliga ovan berörda kulturkaraktärer fullständigt, trots att de i patogent avseende representera åtminstone två avsevärt olika typer. I andra fall kunde som ovan påpekats fysiologiska skillnader påvisas hos morfologiskt lika biotyper på betydligt enklare sätt än genom de i flera avseenden komplicerade infektionsförsöken med klöver.

Innan jag ingår på behandlingen av försöken med fysiologiska skillnader (bildning av demarkationslinjer) återstår det dock att nämna något om ett par andra prövade, men ej heller framkomliga vägar till grundandet av en fullständig rasanalys, nämligen variationer i askosporstorleken hos olika biotyper samt skillnader i sklerotiebildning på värdväxten.

Mätningar av sporernas längd och bredd i åtta biotyper ur stammar från geografiskt vitt skilda orter utfördes. Materialet erhölls från 10 olika apothecier inom varje biotyp och från vardera apotheciet mättes 10 sporer. Sklerotierna från samtliga biotyper hade odlats i laboratoriet på samma slags substrat (brödkulturer) och groningen skedde under samma betingelser. Skillnaderna i längd/breddindex mellan de olika biotyperna voro statistiskt osäkra, varför endast askoporlängden angives som mått på eventuella olikheter. Nedanstående tabell 6 med i stigande följd ordnade tal anger medelvärdena av sporlängden hos de åtta biotyperna.

Tabell 6. *Askosporlängd hos åtta biotyper.*
Askosporenlänge bei acht Biotypen.

Biotyp Biotyp	Askosporlängd μ Askosporenlänge μ	Biotyp Biotyp	Askosporlängd μ Askosporenlänge μ
Sval 17—1	14.25 ± 0.13	10 A—2	15.24 ± 0.18
17 C—1	14.84 ± 0.14	Lu 13—1	15.94 ± 0.14
H-g 2—2	14.79 ± 0.12	Sved 4—1	16.15 ± 0.16
W 6—6	15.12 ± 0.14	Teck 4—1	16.30 ± 0.21

En jämförelse av ovanstående tal visar, att statistiskt säkra skillnader finnas mellan en del av biotyperna. Mellan flera av de åtta biotyperna — samtliga enligt andra försök sinsemellan fysiologiskt olika — äro skillnaderna som synas obetydliga och utan statistisk säkerhet. Beträffande de i tabell 6 ingående värdena på askosporlängden vill jag särskilt framhålla, att apothecierna bildades under bestämda miljöförhållanden, och att de härstammade från brödkulturer, varför det med hänsyn till de i föregående kapitel (tabell 5) påvisade modifikationerna är sannolikt, att motsvarande tal från apothecier ur sklerotier bildade på klöver skulle vara cirka 10 % större. Det är ej heller uteslutet, att dessutom yttre miljöskillnader mellan kultur- och naturliga fältförhållanden under själva apotheciebildningen kunna influera på dessa tal, vilka således icke, även om de omräknats till klöver, böra direkt jämföras med motsvarande tal från fältapothecier. Några tillförlitliga undersökningar häröver synas visserligen icke ha utförts med askosporer från högre askomyceter, men från jästsvamparna föreligga exakta uppgifter. Sålunda ha Mrak och Bonar (1938) påvisat, att askus och askosporstorleken hos en del Saccaromyceter påverkas av olika yttre miljöförhållanden. Beträffande en annan, även såsom ganska stabil ansedd, morfologisk karaktär nämligen konidiestorleken föreligga uppgifter om yttre miljöfaktorers avsevärda modifierande inflytande (ex. erysiphacéer, Hammarlund 1925, *Peronospora*arter, Gäumann 1923).

Avsevärda skillnader mellan olika *Sclerotinia*biotyper ifråga om sklerotiebildningen på värdväxten framträdde särskilt tydligt i ett av de större infektionsförsök, som jag de senaste åren utfört på olika stammar av klöver och lucern. Försöksanordningen var densamma, som i ett tidigare meddelande om klöverrötan (Björling 1939) utförligt beskrivits, varför det beträffande detaljerna hänvisas till detta. I försöket, som var förlagt till Sveriges Utsädesförening, Svalöv, ingingo 3 rödklöver-, 3 alsikeklöver- och 3 lucernstammar. Infektionsmaterialet utgjordes av 3 *Sclerotinia*biotyper, en från rödklöver (Sval 16-1), en från alsikeklöver (Sval 17-1) och en från lucern (F-hög 1-1). Dessa tre biotyper hade varit i kultur lika lång tid (cirka 4 månader), innan försöket påbörjades i september 1939. Det till infektionen använda sklerotiemjölet framställdes dagen innan denna utfördes, varför av åldern betingade modifikationer i biotypernas vitalitet synas vara uteslutna. De två från rödklöver och alsikeklöver härstammande svampbiotyperna voro icke skiljbara i kultur (på agarplattor), under det att den från lucern härstammande företedde en konstant avvikande »morfotyp» med färre och större sklerotier. Inga degenerationstecken ha hittills (december 1941) iakttagits i vegetativa förökningar på agar i någon av dessa tre biotyper.

Med varje svampbiotyp (huvudförsöksled) infekterades samtliga klöver- och lucernstammar. Inom vardera av de tre från varandra isolerade huvudförsöksleden var varje värdväxtstam representerad av tre upprepningar (lådor med plantor). Antalet lådor i hela försöket utgjorde sålunda 81, och det sammanlagda antalet plantor uppgick till 16 728. Infektionen utfördes den 25/9 1939, och mycket kraftig mycelväxt i samtliga lådor konstaterades efter 14 dagar. Angreppet var dock redan vid denna tidpunkt märkbart kraftigare i de med svampbiotypen från alsikeklöver infekterade lådorna, ett förhållande som vid försökets avslutande också gav sig till känna genom att så gott som samtliga plantor i detta huvudförsöksled dödats, vilket ej var fallet i de två övriga. I mitten av november samma år, alltså efter cirka 7 veckor hade angreppet i alla lådorna utsträckt sig till samtliga plantor, av vilka många redan voro dödade och resten så starkt infekterade, att endast små skott vid rothalsen ännu voro levande. Sklerotier iakttogos på en del av de döda plantorna. I slutet av november, då myceltillväxten i stort sett syntes vara avslutad, gjordes en bonitering av försöket efter en 10-gradig skala med varje grad representerande 10 % dödade plantor. Siffrorna från denna bonitering överensstämde i stort sett med de slutgiltiga angreppsprocenterna, vilka fastställdes genom räkning av antalet levande plantor 8/4 1940. Vid detta senare tillfälle insamlades från en yta av 1 dm^2 i varje låda samtliga makroskopiskt iakttagbara sklerotier, vilka efter torkning räknades och vägdes. Medeltemperaturen vid den meteorologiska stationen i Lund var under den tid angreppet varade för okto-

ber + 5.9°, för november + 4.8°. Luftfuktigheten i försöket var praktiskt taget 100 %.

Såsom redan i inledningen framhållits, är det icke min avsikt att i det föreliggande arbetet diskutera orsakerna till resistensskillnader mellan olika värdväxtstammar eller kloner. Ur det ovannämnda försöket äro därför endast vissa led uttagna, vilka belysa skillnaderna i sklerotiebildning. Vidare har diskussionen i detta avseende begränsats till resultaten från röd- och alsikeklöver med de två, i agarkulturer icke skiljbara, från dessa värdväxter härstammande *Sclerotinia*biotyperna (Sval 16-1 och Sval 17-1).

Tabell 7. *Sklerotiebildning på klöver hos två olika Sclerotiniabiotyper. 8.019 plantor.*

Sclerotienbildung auf Klee bei zwei verschiedenen Sclerotiniabiotypen. 8.019 Pflanzen.

Värdväxt Wirtspflanze	Sclerotiniabiotyp Sclerotiniabiotyp					
	Sval 16—1			Sval 17—1		
	% dödade plantor % getötete Pflanzen	Sklerotier per dm.² Sclerotien per dm.²		% dödade plantor % getötete Pflanzen	Sklerotier per dm.² Sclerotien per dm.²	
		Antal Anzahl	Vikt mg. Gewicht mg.		Antal Anzahl	Vikt mg. Gewicht mg.
3 rödklöverstammar (9 obs. per svampbiotyp) 3 Rotkleestämme (9 Beobacht. per Pilzbiotyp)	63.4±7.1	1.3±0.8	6.1±4.2	98.3±0.5	46.3±7.7	727.2±170.8
3 alsikeklöverstammar (9 obs. per svampbiotyp) 3 Schwedenkleestämme (9 Beobacht. per Pilzbiotyp)	55.3±7.6	0.2±0.2	1.1±1.1	91.3±4.1	33.2±4.7	435.0±116.4

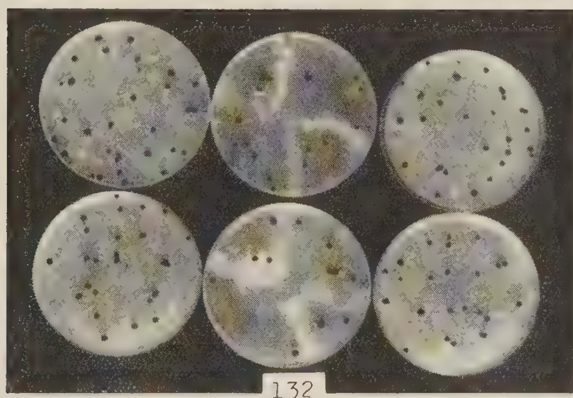
Av tabell 7 framgår att sklerotiebildningsförmågan på värdväxten var väsentligt olika hos de båda *Sclerotinia*biotyperna. Visserligen hade av den ena biotypen (Sval 17-1) cirka 1.5 gånger så många plantor dödats, men antalet sklerotier var i denna biotyp cirka 53 gånger så många som i den andra. Även den genomsnittliga sklerotievikten i biotypen Sval 17-1 var cirka 3 gånger så stor som i biotypen Sval 16-1. Trots att denna metod att differentiera i kultur morfologiskt icke skiljbara *Sclerotinia*biotyper, på grund av sin tidsödande beskaffenhet icke kan få något praktiskt värde, har detta försök dock så pass utförligt behandlats av den anledningen, att de väsentliga skillnaderna i sklerotiebildning enligt min mening måste tillmätas stor vikt vid bedömningen av olika *Sclerotinia*biotypers allmänna patogena betydelse.

Bildning av demarkationslinjer mellan olika biotyper av S. trifoliorum.

Redan föreliggande erfarenheter angående bildning av demarkationslinjer hos andra svampar. Det är en tämligen allmän företeelse att m. e. m. utpräglade, makroskopiskt synliga linjer av ett eller annat slag uppkomma mellan de kolonier, som bildas, om två eller flera mycel från samma eller olika svamparter odlas samtidigt på en näringsagarplatta (HARDER 1911). I vissa fall äro linjerna tydliga endast mellan olika stammar (kloner) inom samma art, under det att mycel från samma klon hopväxa, utan att gränsen blir makroskopiskt märkbar. Det sistnämnda fallet har närmare studerats av CAYLEY (1923) hos *Diaporthe perniciosa*. Vid odlingsförsök med denna svamp bildades markanta »lines of aversion» mellan vissa härstamningar, därigenom att tillväxten hos de olika mycelen avstannade, innan kontakt uppnåddes. I en zon i agarn mellan kolonierna bildades smala, djupa sprickor. I princip likartade iakttagelser ha gjorts av PORTER (1924) på en del olika askomyceter; av MOUNCE (1929) på *Fomes pinicola* samt av SCHREINER (1931) på *Valsa sordida* och *nivea*. I vissa av dessa fall framträdde skillnader i intensitet vid linjebildningen. Förklaringen till demarkationslinjebildningen antages av samtliga ovannämnda författare ligga i en m. e. m. utpräglad aversion mellan de olika mycelen. Närvaron av toxiska, på den normala ämnesomsättningen i de främmande mycelen störande substanser förutsättes.

Egna undersökningar. Vid odlingsförsök med olika biotyper av *S. trifoliorum* gjorde jag följande iakttagelser. När två eller flera olika biotyper odlades samtidigt på samma näringsagarplatta genom ympning på olika punkter bildades på de ställen, där de olika mycelen kommo i kontakt med varandra, först distinkta smala (Fig. 134, 135) sedermera bredare (Fig. 132) vita linjer bestående av mikrokonidier. Dessa demarkationslinjer framträdde vid rumstemperatur makroskopiskt cirka 20 dagar efter ympningen, d. v. s. 10—14 dagar efter det kontakt mellan mycelen uppnåtts. Vid liknande odlingar av mycel eller askosporer från samma biotyp bildades inga linjer (Fig. 132). Linjebildning uteblev vidare i följande fall: mellan ensporkulturer från olika apothecier ur samma biotyp; mellan ensporkulturer och mycel från det sklerotium, ur vilket det sporproducerande apotheciet uppkommit; mellan sterila (Kap. II, 3) och fertila sporavkommor från samma biotyp. Frånvaron av linjer i dessa fall visar, att den ovan beskrivna typen av mikrokonidiebildning ej är någon miljöbetingad reaktion, framkallad av uteslutande fysikaliska orsaker eller allmänna intrabiotypiska ämnesomsättningsstörningar utan en interbiotypisk reaktion bunden till fysiologiska, sannolikt genotypiskt betingade olikheter i de hopväxande mycelen.

Mikroskopiska studier av utvecklingsförloppet i kontaktzonen mellan två mot varandra växande mycel visade, att hyferna från det ena växte in mellan hyferna från det andra på samma sätt, vare sig det var frågan om mycel från samma eller olika biotyper. I båda fallen bildades talrika anastomoser mellan de mötande hyferna, varigenom en blandning av plasma och kärnor kom till stånd i vissa celler i kontaktzonen. Efter en till ett par da-



Ympschema:

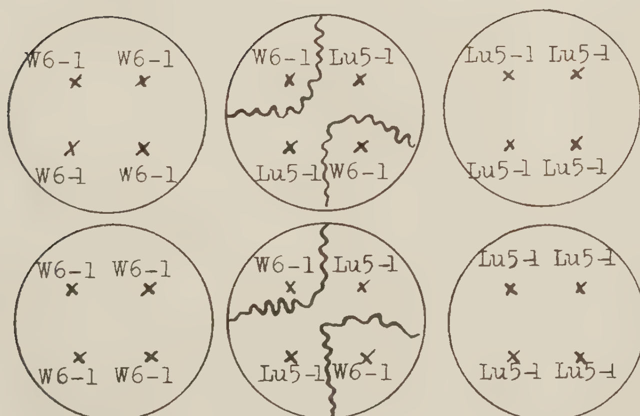


Fig. 132. Demarkationslinjer mellan mycel från olika biotyper. De två vänstra plattorna ympade med enbart W 6—1; de två högra enbart med Lu 5—1. De två mittersta med mycel från båda biotyperna.

Demarkationslinien zwischen Myzeln von verschiedenen Biotypen. Die zwei linken Platten geimpft mit nur W 6—1; die zwei rechten nur mit Lu 5—1. Die zwei mittleren mit Myzeln von beiden Biotypen.

gar bildades i denna zon mellan mycel från olika biotyper först konidiebärare och därefter rikligt med mikrokonidier, vilka efter ytterligare några dagar blevo makroskopiskt synliga. Mellan mycel från samma biotyp uteblev denna reaktion, som förut påpekats, fullständigt. — I intet fall iakt-

tog jag någon helt mycelfri zon mellan två mycel, vilket NICOLAISEN et al. (1940) i ett fall iakttogo mellan två morfologiskt olika mycel. Hyferna i mitt material voro däremot i flera fall såväl mellan sammanväxande mycel från samma som från olika biotyper glesare i själva kontaktzonen än i koloniernas centralare delar. Särskilt märkbart framträdde detta vid biotyper, som hade välutvecklat submerst mycel. På agarytan uppnåddes emellertid med säkerhet i mitt material i samtliga fall (cirka 3.200) kontakt mellan de mot varandra växande mycelen.

Det förekommer alltså av det föreliggande materialet att döma hos *S. trifoliorum* icke någon aversion mellan genotypiskt skilda mycel i den bemärkelsen, att hyferna undvika varandra, vilket t. ex. i särskilt hög grad är fallet hos den ovannämnda *Diaporthe perniciosa* (CAYLEY 1923). Ej heller synes det nödvändigt att hos *S. trifoliorum* förutsätta en närvaro av specifika toxiska substanser som orsak till bildningen av demarkationslinjerna. Den plötsliga blandningen av biotypfrämmande cellkärnor och plasma synes i och för sig vara tillräcklig för att åstadkomma en ämnesomsättningsstörning med ifrågavarande reaktion som synlig följd. Det ligger alltså enligt min mening närmast till hands att tolka den interbiotypiska mikrokonidiebildningen som en efterverkan av en serologisk primärreaktion, vilken kan ha framkallats genom blandningen av biotypfrämmande äggviteämnen i cellerna i kontaktzonen. För att denna synliga efterverkan skall kunna komma till stånd fordras emellertid dessutom, att antingen rent mekaniska eller av utsöndringsprodukter i substratet betingade villkor skola vara uppfyllda, nämligen att de heterokaryotiska och heteroplasmatiska cellerna icke få tillfälle till normal, ohämmad vegetativ växt. Båda dessa förutsättningar synas i större eller mindre grad vara realiserade i kontaktzonen mellan de hopvuxna mycelen. Att en viss stabilisering trots kärn- och plasmablandning åtminstone i vissa fall efter hand kan inträffa, om dylika miktohaplontiska celler få tillfälle att vidareutvecklas, framgår därav att heterokaryotiska mycel kunna växa med en mikrokonidiebildning, som icke överskrider den normala intrabiotypiska. Exempel härpå är bl. a. den stabilt heterokaryotiska stammen Åk 1 (sid. 107).

Bildningen av demarkationslinjer skedde med olika intensitet. Vissa biotyper reagerade regelbundet starkare och vid kombination mellan två dylika biotyper blevo linjerna särskilt kraftiga. De svagast reagerande biotyperna bildade dock sinsemellan så utpräglade linjer, att ingen som helst tvekan kunde uppstå vid bedömningen om linjebildning inträffat eller ej. Starkt och svagt reagerande biotyper förekommo jämt fördelade över hela materialet. Reaktionstypens intensitet förefaller alltså vara huvudsakligen bunden till biotypen och ej enbart till skillnaden mellan två biotyper.. Bildningen av demarkationslinjer synes dock av de hittills gjorda iakttagelserna att döma ibland ske något kraftigare mellan två medelmåttigt reage-

rande biotyper från geografiskt skilda orter än mellan två olika biotyper av medelstark reaktionstyp från samma ort. Dessa skillnader äro dock så osäkra, att de f. n. icke kunna läggas till grund för en bedömning av biotypolikheternas grad.

Talrika observationer bekräftade vidare, att bildningen av demarkationslinjer mellan olika biotyper måste betraktas som en sannolikt generell företeelse. Frånvaron av dylika linjer mellan två eller flera okända mycel kan visserligen icke utan vidare tagas som ett fullt bindande bevis för att dessa mycel äro genetiskt identiska, men vissa skäl tala starkt för, att så verkligen är fallet. Vid jämförande odlingar av många stammar från en begränsad areal (cirka 1.000 m² i en klövervall) bildades i allmänhet demarkationslinjer mellan flertalet. Mellan vissa bildades inga linjer, och dessa stammar voro i regel isolerade nära varandra på avstånd varierande mellan några centimeter och några meter. Detta förhållande kan — med stöd av i det följande framlagda fakta — sannolikt förklaras genom antagandet av ett för de icke-linjebildande stammarna gemensamt ursprung från samma homokaryotiska mycel. Stammarna härstammade från enstaka sklerotier eller apothecier — beroende på i vilken form stammen isolerats — och dessa skulle i så fall representera olika individ ur en och samma biotyp.

Ett av skälen för åsikten att icke-linjebildande mycel äro genetiskt identiska framkom vid studiet av sammansättningen av de från fältmaterial härstammande sporavkommorna ur i laboratoriet uppdragna eller direkt isolerade apothecier. Vid samtidig odling av flera ensporkulturer från ett och samma apothecium bildades i flertalet fall inga demarkationslinjer mellan kulturerna. Nya generationer av sexuellt bildade sporavkommor ur apothecier från sklerotier i dessa ensporkulturer förhöllo sig inbördes och gentemot moderkulturerna på samma sätt. Sporavkommorna från de ursprungliga fältapothecierna reagerade alltså i dessa fall på exakt samma sätt som i laboratoriet renodlade biotyper. Då vidare, som förut nämnts, hos *S. trifoliorum* apothecier kunna bildas ur homokaryotiska mycel, är det ytterst sannolikt, att de ifrågakommande stammarna voro rena biotyper. De från ett fältapothecium av detta slag i massvis utslungade sporerna infektera huvudsakligen de närmast stående klöverplantorna, i vilka senare sklerotier bildas. Trots att åtskilliga olika biotyper enligt vad som framgått av de utförda analyserna kunna förekomma samtidigt på relativt begränsade arealer — några tiotal m² — böra dock med en viss sannolikhet enstaka sporinfektioner från samma biotyp på olika klöverplantor i den omedelbara omgivningen giva positiva resultat, d. v. s. sklerotier, ur vilka senare apothecier utvecklas. Dessa representera i så fall olika individ ur samma biotyp och bilda följaktligen sinsemellan inga demarkationslinjer i kultur. Ur detta sannolika förhållande kan en förklaring erhållas till de

ovan relaterade fallen av icke-linjebildande stammar från närliggande punkter inom små områden.

Vid samtidig odling av ensporkulturer från vissa stammar bildades demarkationslinjer mellan en del av kulturerna även *då sporerna härstammade från samma apothecium*. Då utgångsmaterialet vid de först gjorda observationerna av detta slag utgjordes av direkt från fältet insamlade apothecier, kunde man ha skäl att misstänka, att föroreningar i form av sporer från främmande biotyper på hymeniets yta, hade medföljt de biotypegna sporerna till de spridningsplattor, ur vilka isoleringarna av ensporkulturerna försiggått. Detta var dock i och för sig mindre sannolikt dels med hänsyn till frekvensen av olika myceltyper inom dessa kulturer, dels av den anledningen att fältapothecierna, som insamlades var för sig i sterila glasrör, innan den till isoleringarna använda sporkastningen i regel en eller ett par gånger utslungat sporer, varvid eventuella föroreningar borde ha avlägsnats från apotheciernas yta. För att helt eliminera det osäkerhetsmoment som användningen av fältapothecier som utgångsmaterial i varje fall syntes innebära insamlades i stället fältsklerotier, vilka var för sig under sterila förhållanden (glasburkar med vattenagar) fingo bilda apothecier. Kombinationskulturer med ensporkulturer från dessa visade, att även i så behandlat material vissa apothecier hade en heterogen sporavkomma (demarkationslinjebildning inom sporavkomman från ett och samma apothecium). Heterogeniteten var i intet fall fullständig; endast vissa sporer bildade till reaktionstypen olika mycel, de från andra sporer utväxande mycelen voro lika (ingen bildning av demarkationslinjer). Olikheterna och likheterna mellan ensporkulturerna förhöllo sig konstanta även vid prövning av sexuellt men autogamt bildade avkommor från de olika mycelen. Dessa förhållanden styrka det redan tidigare gjorda antagandet, att skillnaderna mellan till reaktionstypen olika mycel ej äro orsakade av ett tillfälligt fysiologiskt status hos plasman utan stabila och följaktligen genotypiskt betingade differenser. Vidare synes det med hänsyn till mekanismen vid sporbildningen och med stöd av det förhållandet att till reaktionstypen olika sporer kunna bildas icke blott i samma apothecium utan även i samma askus (sid. 112) antagligt, att det genotypiska underlaget till de fysiologiska olikheterna ligger i cellkärnan och icke enbart i cytoplasman. Detta antagande bestyrkes vidare av resultaten från kombinationsförsök med morfologiskt och fysiologiskt olika biotyper (sid. 116).

Av ovanstående utredning framgår, att de ifrågavarande fältsklerotierna och apothecierna med heterogen sporavkomma icke rimligtvis kunna tolkas på annat sätt, än att de äro heterokaryotiska. Vidare framgår det av de gjorda iakttagelserna, att bildningen av demarkationslinjer kan läggas

till grund för en detaljerad biotypanalys såväl av material från samma som från skilda orter. Det synes mig även välmotiverat, att vid denna analys uppställa den arbetshypotesen, att bildningen av demarkationslinjer mellan två okända mycel tages såsom ett mycket säkert tecken på att de äro genotypiskt olika, och vidare att frånvaron av linjer i varje fall betraktas som en indikator på att mycelen med stor sannolikhet äro genotypiskt lika.

Vid de i det följande relaterade analyserna av heterokaryotiska stammar bestod utgångsmaterialet av apothecier, som bildats av från fältet insamlade sklerotier, vilka lagts till groning var för sig i skilda sterila glasburkar med vattenagar. — Vid spridning av sporer från ett heterokaryotiskt apothecium på en agarplatta inträffade vid rumstemperatur efter cirka en vecka riklig och makroskopiskt märkbar mikrokonidiebildning över hela plattan. Bilden var densamma som vid blandning av sporer från två eller flera biotyper, vilket förhållande tidigare diskuterats och avbildats (sid. 67, Fig 116). I spridningsplattorna från homokaryotiska apothecier inträffade vid de använda spormängderna (några hundra per platta), som förut påpekats, ingen makroskopiskt märkbar mikrokonidiebildning efter samma tid. Härigenom var det möjligt, att på ett tidigt stadium i analyser av fältmaterial få en första hands uppfattning om frekvensen av heterokaryotiska stammar inom materialet. Ett annat tillförlitligt och utrymmesbesparande tillvägagångssätt, som samtidigt utgjorde en kontroll på det föregående, var följande. Vid uttagningen av sporer från spridningsplattorna isolerades 10—20 enskilda sporer i kulturrör; på en agarplatta ympades dessutom samtidigt från varje apothecium på cirka ½ radies avstånd från plattans centrum ett hundratal sporer i en punkt; motsvarande punkt på andra halvan av agarplattan ympades med en spor från samma apothecium. De från de båda ympställena utväxande mycelen utbredde sig i regel med ungefär samma hastighet och möttes sålunda i mitten av plattan. Här bildades en demarkationslinje, om spormaterialet härstammade från ett heterokaryotiskt apothecium; i annat fall bildades ingen linje (Fig. 133). Med ledning av reaktionen i dessa plattor kunde mycel från de i kulturrören magasinerade ensporkulturerna efter behov uttagas för att samodlas i för en detaljerad analys erforderligt antal kombinationer.

2. Analys av fältmaterial.

Med hänsyn till det mycket stora antal kombinationer, som skulle erfordras för en fullständig analys av samtliga i kultur varande stammar och biotyper, och den brist på överskådlighet som skulle följa därmed, uppdelades materialet i ett smärre antal grupper. Inom vardera av dessa utfördes alla erforderliga kombinationer på så sätt, att mycelet från varje stam eller bio-

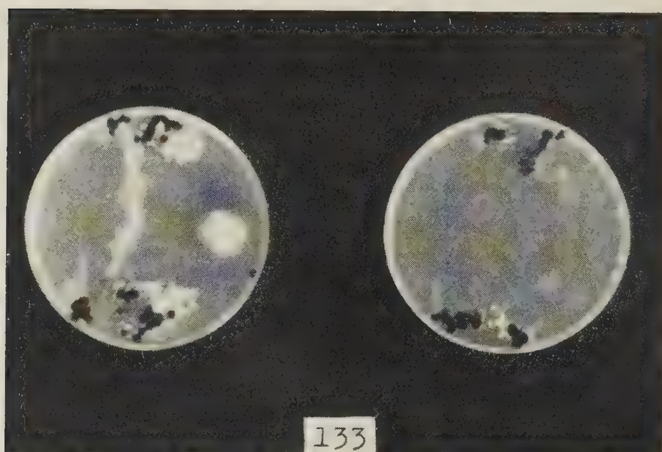
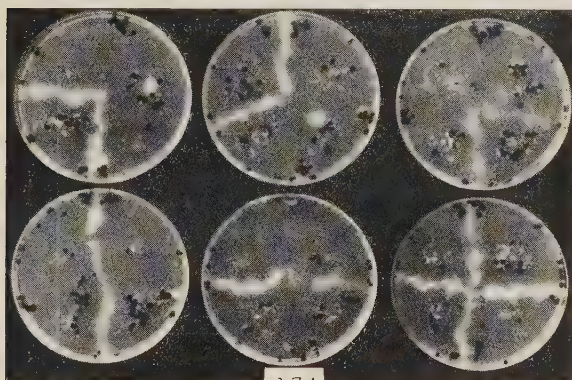


Fig. 133. Demarkationslinjebildning vid sporympning från heterokaryotiska apothecier. Båda plattorna ympade på samma sätt med cirka 100 sporer i en punkt på högra halvan och en spor i motsvararande punkt på vänstra halvan. Spormaterialet i den vänstra plattan härstammade från ett heterokaryotiskt apothecium; i den högra plattan från ett homokaryotiskt apothecium.

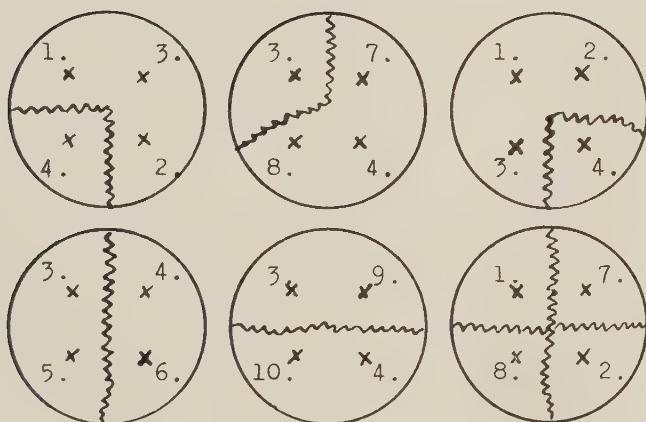
Demarkationslinienbildung bei Sporenimpfung von heterokaryotischen Apothecien. Beide Platten auf die gleiche Weise geimpft mit cirka 100 Sporen in einen Punkt auf der rechten Hälfte und einer Spore in einem entsprechenden Punkt auf der linken Hälfte. Das Sporenmaterial stammte von einem heterokaryotischen Apothecium die linke Platte betreffend: das in der rechten Platte von einem homokaryotischen Apothecium.

typ fick tillfälle att i minst ett fall komma i kontakt med vart och ett av de övriga mycelen. Ympmaterialet till dessa kombinationskulturer bestod av likstora och likvärdiga agarkuber innehållande mycelspetsar, vilka tagits från kanten av i tillväxt varande moderkulturer. På varje agarplatta ympades samtidigt fyra olika mycel efter ett bestämt schema i hörnen på en kvadratisk figur med varje sida ungefär motsvarande plattans radie och tyngdpunkten i plattans mitt (jfr Fig. 134). De fyra utväxande mycelen ockuperade vardera ungefär en kvadrant av plattan och i beröringslinjerna uppkommo allt efter mycelens likhet eller olikhet vita streck av mikrokonidier i form av m. e. m. räta vinklar av två radier, hela diametrar, kors- (Fig. 134) eller T-formiga figurer (Fig. 135). I regel utfördes varje plattkombination i två, i vissa fall i tre upprepningar.

Grupp 1. Denna grupp omfattade vegetativa förökningar av stammar från 22 skilda orter. Varje ort representerades av en stam. Materialet hade följande härstamningar: Skåne 10, mellersta och norra Sverige 2, Danmark 5 och U. S. A. 5 stammar. Försöket resulterade i att demarkationslinjer bildades i samtliga erforderliga kombinationer. Alla 22 stammarna voro således olika.



Ympschema:



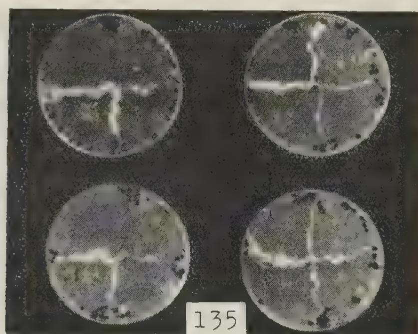
Reaktionstyp a: 1, 2, 3, 5, 9.

,, b: 4, 6, 7, 8, 10.

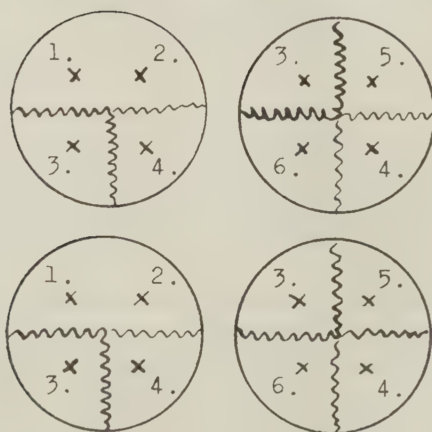
Jfr. tab. 9.

Exempel på ensporkombinationskulturer ur ett heterokaryotiskt apothecium (Sval 68).

Beispiele für Einzelsporenkombinationskulturen aus einem heterokaryotischen Apothecium (Sval 68).



Ympschema:



Reaktionstyp a: 1, 2,
" b: 3.
" c: 4.
" d: 5.
" e: 6.

Ytterligare två typer isolerades ur detta apothecium. Dessutom förekommo flera representanter för typerna b och d.

Exempel på ensporkombinationskulturer ur ett heterokaryotiskt apothecium (Åk 1).

Beispiele für Einzelsporenkombinationskulturen aus einem heterokaryotischen Apothecium (Åk 1).

I åtta fall analyserades askosporerna från enstaka apothecier representerande lika många stammar. Analyserna visade, att dessa stammar samtliga voro homokaryotiska. Med hänsyn till att materialet inom denna grupp vid tiden för dessa analyser varit i kultur minst ett, i några fall i två eller flera år kunde emellertid inga säkra slutsatser dragas om alla dessa åtta stammar också från början varit homokaryotiska. Det visade sig nämligen vid undersökningar på annat heterokaryotiskt material, att en längre tids kultur med upprepade vegetativa förökningar åtminstone i vissa fall resulterade i en »renodling» av bestämda biotyper. Två år 1940 undersökta heterokaryotiska stammar från Svalöv, voro sålunda vid analys ett år senare båda homokaryotiska. En stam från Åkarp (Åk 1) däremot, som under ett års tid analyserades tre gånger med mellanliggande perioder av vegetativ förökning, var alla gångerna heterokaryotisk. Renodlingen av de två förstnämnda stammarna torde bero på en ofrivillig selektion vid de vegetativa förökningarna i kulturrören. I regel skedde dessa på så sätt att ett mindre agarstycke innehållande mycel jämte ett sklerotium överflyttades till det färska substratet. Trots detta försiktighetsmått föreföll det, som om i vissa fall de nya kulturerna härstammade från några få eller endast en hyf från ympmaterialet. Under dylika förhållanden kan det givetvis antagas, att även obetydliga skillnader i de biotypolika cellkärnornas aktuella vitalitet kunde göra sig gällande i form av temporärt snabbare kärndelningar med en förskjutning i kärnbeståndet och renodling av vissa biotyper som resultat.

Grupp 2. Materialet bestod av två stammar från Svalöv, två från Weibullsholm, Landskrona, och två från Luleå. Analysen visade, att alla utom de två sistnämnda reagerade med demarkationslinjebildning (Tab. 8). De två stammarna från Luleå hade enligt uppgift från lic. Ekstrand isolerats minst 100 meter från varandra.

Grupp 3. Denna grupp omfattade 26 isoleringar från Svalöv, tagna från en klövervall i form av lika många apothecier. Från varje fruktkropp anlades massaskosporkulturer, vilka preliminärt betecknades som olika stammar. Enligt analysen voro flertalet av dessa olika; i tre fall tillhörde dock sporavkommorna från två skilda apothecier och i ett fall från tre apothecier samma reaktionstyp och följaktligen enligt den uppställda arbetshypotesen samma homokaryotiska stam (Se tab. 8). I de fall då en viss stam på klövervallen representerats av skilda individ (apothecier) voro dessa i regel isolerade mycket nära varandra på 5—20 cm. avstånd. Ett undantag bildade två till reaktionstypen identiska apothecier, som växte drygt 15 meter från varandra. Å andra sidan funnos även ett par exempel på att två apothecier, som isolerats på endast cirka 10 cm. avstånd från varandra, voro genetiskt olika. Av stammarna voro 21 homokaryotiska och 5 heterokaryotiska. Någon vidare analys inom de sistnämnda företogs icke.

Tabell 8. *Analys av stammar.*
Analyse von Stämmen.

Grupp Gruppe	Lokal Platz	Antal stammar Anzahl Stämme			Anm. Anm.
		Undersökta Untersucht	Olika Verschied.	Heterokaryotiska Heterokaryotische	
1	22 skilda orter 22 verschied. Stellen	22	22	—	
2	Svalöv (2) Weibullsh. (2) Luleå (2)	6	5	—	De två lika båda fr. Luleå. Die Zwei gleichen beide von Luleå.
3	Svalöv	26	21	5	
4	Svalöv	16	11	7	
5	Dalbytrakten Dalbygegend	10	9	0	
6	Hörbytrakten Hörbygegend	10	6	1	Fem lika från samma fält. Fünf gleiche von demselben Feld.
7	Åkarp	2	2	1	

Grupp 4. Materialet härstammade liksom i föregående grupp från Svalöv men isolerades från fältet i form av enstaka sklerotier. Dessa fingo var för sig bilda apothecier på steril vattenagar. 16 apothecier analyserades. Av dessa voro liksom i föregående försök flertalet olika, men i några fall tillhörde två och två samma reaktionstyp (se tab. 8). 9 stammar voro homokaryotiska och 7 heterokaryotiska. De senare analyserades vidare genom kombinationsförsök med 10 ensporkulturer ur varje apothecium. Resultatet framgår av tabell 9.

Tabell 9. *Analys av 7 heterokaryotiska stammar från Svalöv.*
Analyse von 7 heterokaryotischen Stämmen von Svalöv.

Stam Stamm	Antal ensporkulturer Anzahl Einzelsporenkulturen	Antal biotyper Anzahl Biotypen	Antal biotyper representerade av Anzahl Biotypen vertreten mit					
			1	2	3	4	5	individ Individuen
Sval 65	10	5	1	3	1	-		
Sval 66	10	7	5	1	1	—	—	
Sval 68	10	2	—	—	—	—	2	
Sval 70	10	5	2	1	2	—	—	
Sval 74	10	3	—	—	2	1		
Sval 76	10	7	4	3	—	—	—	
Sval 77	10	5	2	1	2	—	—	

Grupp 5. Denna grupp omfattade 10 stammar från Dalbytrakten (cirka 1 mil OSO Lund), vilka isolerats från fältet i form av apothecier. 8 av dessa härstammade från samma klövervall; de två övriga isolerades på 2 respektive 5 km. avstånd från denna lokal. Analysen visade, att alla utom 2 voro olika. De båda till reaktionstypen identiska apothecierna tillhörde den förstnämnda gruppen av 8 från samma fält och växte på cirka 10 m. avstånd från varandra. Liksom i Svalövsmaterialet noterades exempel på att genotypiskt olika apothecier kunde växa mycket nära varandra. Samtliga stammar voro homokaryotiska.

Grupp 6. Härstamning Hörbytrakten (cirka 5 km. SO Ringsjön, Skåne). 10 stammar, härstammande från apothecier, undersöktes. Av dessa isolerades 7 från ett klöverfält; 2 från ett annat cirka 5 km. därifrån och 1 ungefär 4 km. från de båda föregående fälten. Kombinationsförsöken visade, att inga för de tre lokalerna gemensamma stammar förekommo inom materialet. Av de 7 apothecierna från den första lokalen voro inte mindre än 5 till reaktionstypen identiska. 4 av dessa hade isolerats på 5—10 m. avstånd från varandra och det femte cirka 200 m. från de övriga. De återstående stammarna voro alla olika. Ett apothecium var heterokaryotiskt och de övriga homokaryotiska.

Grupp 7. Denna grupp omfattade endast två stammar från Åkarp, vilka uppdragits ur enstaka fältsklerotier. Båda voro olika; den ena homokaryotisk och den andra heterokaryotisk. Analys av ett apothecium från den sistnämnda visade, att tio ensporkulturer fördelade sig på 7 biotyper representerade av 2, 2, 2, 1, 1, 1, 1 individ. Biotypvariationen inom denna stam var alltså av samma storleksordning som i de heterokaryotiska stammarna från Svalöv (jfr tab. 9).

Resultaten från analyserna av grupperna 1—7 visa med en hög grad av sannolikhet, att biotyprikedomen inom arten är mycket stor, såväl mellan olika orter som inom samma lokal (klövervall). Med något mindre säkerhet framgår vidare av dessa analyser, att vissa biotyper kunna vara företrädda av flera olika individ, vilka i regel växa nära varandra men ibland förekomma på minst 100 m. avstånd från varandra.

Siffrorna från analyserna av de heterokaryotiska, från fältsklerotier härstammande apothecierna (Tab. 9) erbjuda i och för sig inget säkert underlag för en mera detaljerad genetisk analys, då i detta fall föräldrabiotyperna voro okända. Det är vidare att märka, att de cytologiska undersökningsresultaten icke utesluta den teoretiska möjligheten, att mera än två slags genotypiskt olika kärnor kunna ingå i ett heterokaryotiskt fältsklerotium, och att således det därifrån utväxande apotheciets dikaryofas kan bestå av olikvärdigt allogama askogena hyfer. Förekomsten av flera till reaktions-

typen lika och följaktligen enligt den uppställda arbetshypotesen även genotypiskt lika sporer inom ett så begränsat antal som 10 från varje apothecium antyder emellertid att antalet på detta sätt åtkomliga gendifferenser inom populationen på en och samma lokal ej är mycket stort. Särskilt intresse erbjuder den heterokaryotiska stammen Sval 68 (Tab. 9), som vid analys endast uppvisade två till reaktionstypen olika sporgrupper, vilket antyder möjligheten av att en monofaktoriell klyvning i detta fall förelåg, och att i så fall föräldrabiotyperna till denna stam endast skulle ha varit skilda ifråga om en enda på reaktionstypen inverkande gen. Under förutsättning att den uppställda arbetshypotesen såväl till sin positiva som till sin negativa del överensstämmer med verkligheten, bör detta vidare innebära, att de båda föräldrabiotyperna endast skulle ha varit skilda i en enda gen överhuvudtaget.

Resultaten från dessa analyser av fältmaterial komma senare, med stöd av kompletterande iakttagelser från i laboratoriet framställda heterokaryotiska apotheciers avkomma, att ytterligare diskuteras (sid. 129).

3. Syntes av laboratoriematerial.

Under denna rubrik behandlas några korsningsförsök med i laboratoriet renodlade biotyper av *S. trifoliorum*. Vid odling av två olika biotyper på samma näringsagarplatta bildades — om ympningen skedde på skilda punkter — endast ytterst sällan sklerotier i kontaktzonen mellan mycelen. Om de båda biotyperna ympades på samma punkt t. ex. i centrum av plattan, på så sätt att mycel blandades i ympstället, utmärktes de utväxande kulturerna i de fall då blandningen i ympstället ej varit alltför intim av m. e. m. breda radiära sektorer med riklig mikrokonidiebildning (Fig. 136). Denna företeelse var utan tvivel av samma karaktär som bildningen av demarkationslinjer vid sammanväxningen av mycel från olika biotyper. Mikrokonidiebildningen indikerade i båda fallen sådana partier av kulturen, i vilka mycel från båda biotyperna voro i kontakt med varandra. I sektorerna bildades ej sällan sklerotier, vilka följaktligen kunde tänkas vara uppbyggda av mycel från båda biotyperna, något som också enligt efterföljande analyser ibland visade sig vara fallet.

Upprepade försök med dylika kombinationskulturer, varvid intimare blandningar av mycel, askosporer eller sklerotiemjöl från olika biotyper kom till användning, visade, att mikrokonidiebildningen i en del fall minskades avsevärt och i andra helt uteblev. Mycelet och sklerotierna i många av dessa kulturer voro även ibland enligt de följande analyserna heterokaryotiska trots ingen eller ringa ökning i mikrokonidiebildningen, vilket visar, att m. e. m. stabila miktohaplonter hade bildats. Kombinationsförsök med ensporkulturer från apothecier ur sklerotier från dylika kombinations-

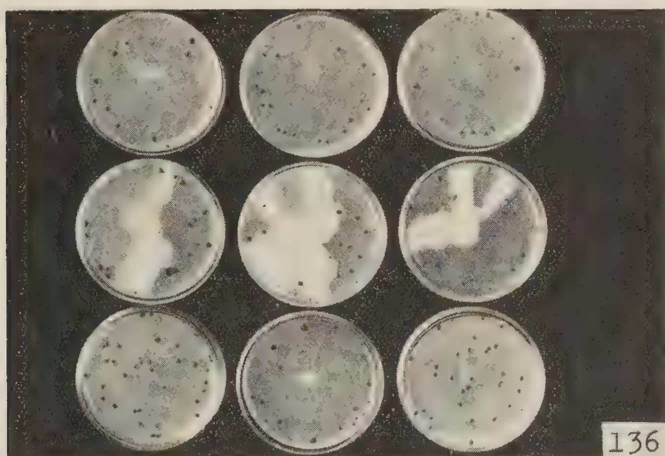


Fig. 136. De tre översta plattorna ympade i centrum med mycel ur olika ensporkulturer ur biotypen W 6—1; de tre nedersta likaledes ur biotypen Lu 5—1. Plattorna i mittelraden ympade på samma sätt men med mycel från båda biotyperna. Riklig interbiotypisk mikrokonidiebildning i dessa

Die drei obersten Platten geimpft im Zentrum mit Myzeln aus verschiedenen Einzelsporenkulturen aus Biotyp W 6—1; die drei untersten ebenfalls aus Biotyp Lu 5—1. Die Platten in der Mittelreihe wurden auf dieselbe Weise geimpft, aber mit Myzeln von beiden Biotypen. Reichliche interbiotypische Mikrokonidienbildung in diesen.

kulturer visade nämligen att sporerna från en del apothecier uteslutande tillhörde den ena eller den andra av ursprungsbiotyperna; ensporkulturer från andra apothecier bildade däremot demarkationslinjer såväl inbördes som med båda ursprungsbiotyperna. I de senare fallen hade alltså nya biotyper uppkommit, och korsningarna följaktligen lyckats. Av några på klöverplantor utförda infektionsförsök med mycel från skilda biotyper framgick, att även i värdväxten heterokaryotiska sklerotier och apothecier kunde resultera från blandinfektioner. Undersökningar av sporerna från tre olika apothecier ur sklerotier från ett dylikt försök (K 17+Sval 21—1× W 6—1) visade nämligen, att ett av apothecierna var heterokaryotiskt; de båda övriga voro homokaryotiska och överensstämde med den ena av föräldrabiotyperna (Sval 21—1).

Försök nr 7/40. Föräldrabiotyper Sval 6—36 och W 6—6. Substrat näringsagar. Båda biotyperna voro självfertila och morfologiskt väl överensstämmande men bildade demarkationslinjer med varandra. Sporavkomman från sju apothecier ur lika många isolerade sklerotier från en kombinationskultur undersöktes. Tre av apothecierna (nr 1—3) fingo kasta sporer, och dessa isolerades på vanligt sätt med nål ur spridningsplattorna. Ett av dessa tre apothecier visade sig vara homokaryotiskt och tillhörande

biotypen W 6—6. De två andra voro heterokaryotiska, då demarkationslinjer bildades mellan alla ensporkulturerna, vilka samtliga voro morfologiskt lika med Sval 6—36 och W 6—6. Demarkationslinjer bildades även med båda föräldrabiotyperna.

Ur de fyra övriga apothecierna uttogos sporer direkt från aski med hjälp av mikromanipulator. Vid isoleringen togs ingen hänsyn till sporernas inbördes placering i askus. Endast ett av dessa apothecier visade sig vara heterokaryotiskt (nr 6), de övriga tre tillhörde alla den ena föräldrabiotypen (W 6—6). Från det heterokaryotiska apotheciet isolerades sporer från två aski. Kombinationsförsök med dessa och föräldrabiotyperna visade, att i varje askus åtminstone två nya biotyper bildats, vardera representerade av 1, 1, 2 och 1 individ (ensporkultur). Samtliga fyra biotyper voro dessutom inbördes olika. För överskådlighetens skull ha resultaten från detta försök sammanställts i nedanstående tabell 10. Den dåliga grobarheten hos sporerna från apothecierna 4—7 kan sannolikt förklaras därav, att mikromanipulatornålarna i en del fall åstadkommit vitala skador på spormembranerna. Aski hos *S. trifoliorum* äro nämligen ett långt ifrån idealiskt material för utförande av operationer med mikromanipulator, enär väggen i för ändamålet lämpade aski erbjuder ett segt motstånd och avsevärt våld kräves för att isolera sporerna.

Tabell 10. *Analys av apothecier ur korsningen Sval 6—36 × W 6—6.*
Analyse von Apothecien aus der Kreuzung Sval 6—36 × W 6—6.

Apothecium nr Apothecium Nr	Askus Nr Askus Nr	Isolerade sporer Isolierte Sporen	Grodda sporer Gekeimte Sporen	Antal biotyper Anzahl Biotypen	Individ per biotyp Individuen per biotyp
1	—	10	10	1=W	10
2	—	12	11	11	1
3	—	10	10	10	1
4	1 2	6 7	4 2	1=W 1=W	4 2
5	1 2 3	5 5 8	4 3 2	1=W 1=W 1=W	4 3 2
6	1 2	6 5	2 3	2 [1] 2 [1]	1 2,1
7	1 2 3	5 7 8	3 4 3	1=W 1=W 1=W	3 4 3

[1] Samtliga 4 biotyper ur apothecium nr 6 voro olika.
[1] Sämtliche 4 Biotypen aus Apothecium Nr 6 waren verschieden.

Försök nr 24/39. Föräldrabiotyper Sval 6—53 och W 6—13. Substrat näringsagar. Båda biotyperna voro självfertila och morfologiskt lika men bildade demarkationslinjer med varandra. Två apothecier från sklerotier ur en korsningskultur undersöktes. Det första var homokaryotiskt och tillhörde den ena föräldrabiotypen (W 6—13). Det andra var heterokaryotiskt och de 10 i kombinationsförsök undersökta ensporkulturerna bildade samtliga demarkationslinjer inbördes och med båda föräldrabiotyperna. De tio ensporkulturerna representerade således var och en en ny biotyp.

Försök 20/39. Detta försök ingick i en serie av korsningar inom och mellan ännu sklerotiebildande sterila (Kap. II, 3) och fertila biotyper ur olika stammar, vilka bl. a. avsågo att konstatera om en kombination av två sterila mycel kunde resultera i en fertil produkt. Samtliga kombinationer mellan sterila biotyper blevo emellertid resultatlösa, i det att ingen apotheciebildning förekom från sklerotierna ur dylika kombinationskulturer. I alla kombinationer mellan å ena sidan sterila och å andra sidan fertila biotyper bildades däremot apothecier.

Detta försök är ett exempel på ett dylikt fall. Utgångsmaterialet var den självfertila biotypen Sval 6—53 och den sterila W 6—2. Båda voro morfologiskt lika men bildade i samkultur demarkationslinjer med varandra. Endast ett apothecium analyserades och befanns vara heterokaryotiskt. Inalles isolerades 9 sporer, vilka enligt kombinationsförsök alla voro inbördes olika. Samtliga bildade dessutom demarkationslinjer med båda föräldrabiotyperna. 9 nya biotyper hade alltså uppkommit. Detta resultat kan med stöd av tidigare anförda fakta endast tolkas så, att kärnor från såväl den sterila som den fertila ursprungsbiotypen deltagit i utvecklingen av de sporproducerande elementen (dikaryofasen och aski) i apotheciet. Resultatet talar vidare mot antagandet av en generell virus- eller bakterieinfektion som orsak till steriliteten hos vissa biotyper, vilket tidigare diskuterats (sid. 19).

Försök 2/40. Föräldratypen Sval 6—36 och Sved 4—1 båda självfertila men morfologiskt olika (Fig. 137). Substrat näringsagar. Sved 4—1 utmärktes dessutom av en utpräglad jordlukt, vilken helt saknades i Sval 6—36. Biotyperna bildade demarkationslinjer med varandra. Mycelets tillväxthastighet var enligt tidigare, jämförande försök lika hos båda biotyperna. De morfologiska och fysiologiska olikheterna voro även konstanta efter sexuell reproduktion.

Ur en av korsningskulturerna (Fig. 138) utvaldes tre sklerotier. För att pröva reaktionstypen på dessa tillämpades följande förfaringssätt. Varje sklerotium ytsteriliserades genom neddoppning i 95 % alkohol och flammerades, varefter med en steril nål ett stycke av den inre vävnaden försiktigt utpreparerades och ympades på näringsagar. Sklerotierna lades därefter till groning var för sig.

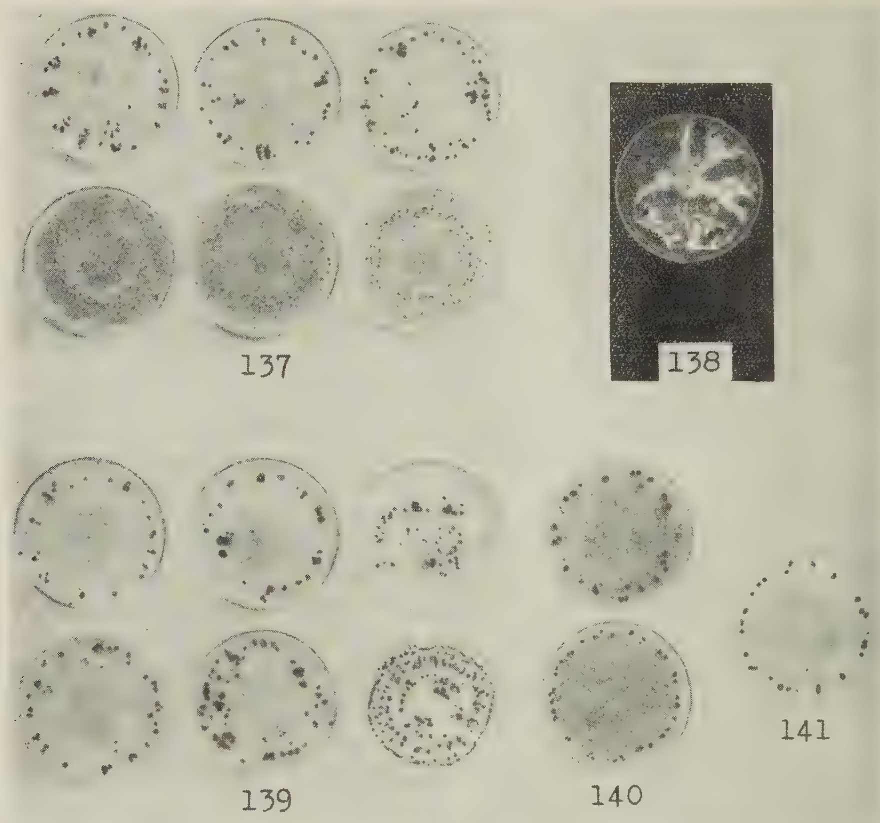


Fig. 137—141. Försök 2—40. 137 De tre plattorna i övre raden biotyp Sval 6—36; de tre i nedre raden biotyp Sved 4—1. 138 Kombinationskultur Sval 6—36 x Sved 4—1. 139—141 Subkulturer från ett sklerotium i kultur 138. 139 Reaktionstyp Sval 6—36. 140 Reaktionstyp Sved 4—1. 141 Reaktionstyp varierande.

Versuch 2—40. 137 Die drei Platten in der oberen Reihe Biotyp Sval 6—36; die drei in der unteren Reihe Biotyp Sved 4—1. 138 Kombinationskultur Sval 6—36 x Sved 4—1. 139—141 Subkulturen von einem Sclerotium in Kultur 138. 139 Reaktionstype Sval 6—36. 140 Reaktionstype Sved 4—1. 141 Reaktionstype variierend.

Ur vardera av de tre kulturer, som bildades från ympningarna med sklerotievävnad, utpreparerades på ett tidigt stadium 10 olika hyfspetsar, vilka förökades var för sig på särskilda plattor. Dessutom prövades de tre kulturerna genom vegetativa förökningar på vanligt sätt med de båda utgångsbiotyperna. Härvid bildade två av kulturerna demarkationslinjer med både Sval 6—36 och Sved 4—1; den tredje linjer endast med Sved 4—1 och icke med Sval 6—36. Den sistnämnda kulturen överensstämde även vid ytter-

ligare vegetativa förökningar såväl morfologiskt som i reaktionstyp exakt med Sval 6—36, varför det är sannolikt, att det motsvarande sklerotiet var homokaryotiskt och tillhörde denna biotyp. De båda förstnämnda kulturerna hade ett oregelbundet utseende med ökad mikrokonidiebildning och omväxlande små och stora sklerotier. I en del subkulturer bildades m. e. m. tydligt markerade sektorer, vilka i morfologiskt avseende närmade sig antingen den ena eller den andra föräldrabiotypen. Härav framgick att de två sklerotier, som givit upphov till dessa kulturer voro heterokaryotiska.

Nio av de tio ovannämnda subkulturerna från hyfspetsuttagningar ur det ena heterokaryotiska sklerotiet undersöktes närmare. Morfologiskt kunde två olika grupper urskiljas, av vilka den ena omfattade 6 plattor (Fig. 139) och i väsentliga drag liknade Sval 6—36; den andra omfattade 3 plattor (Fig. 140, 141) med karaktärer från båda föräldrabiotyperna. Inom den förstnämnda gruppen (nr 1, 2, 3, 4, 6, 7) var dock den morfologiska variationen större än den normala rent modifikativa inom Sval 6—36 och dessutom utmärktes två av plattorna av en svag jordlukt av samma typ som i Sved 4—1. Ett par kulturer voro dock mycket lika Sval 6—44. I den andra gruppen, som genomgående utmärktes av en stark jordlukt, hade en platta (nr 5: fig. 141) ett intermediärt utseende med enstaka små sklerotier spridda över hela agarytan och en perifer ring av stora sklerotier. De två sista kulturerna (nr 9, 10: fig. 140) voro inbördes lika och överensstämde ganska väl med Sved 4—1, dock funnos perifert även i dessa stora sklerotier, vilka mera liknade Sval 6—36.

Kombinationsförsök med dessa 9 subkulturer jämte de båda föräldrabiotyperna gav följande resultat. De 6 kulturerna inom första gruppen reagerade alla lika och i samtliga kombinationer exakt som den rena biotypen Sval 6—36. Vegetativa förökningar från ett par av dessa plattor antogo efter några överympningar även morfologiskt samma jämna utseende som denna biotyp. Mycelet i subkulturerna inom denna grupp innehöll förmodligen antingen uteslutande eller till övervägande delen Sval 6—36-kärnor. Inom den andra gruppen reagerade de två med Sved 4—1 överensstämmande kulturerna (9, 10 Fig. 140) i samtliga överympningar liksom denna biotyp och antogo vid fortsatt vegetativ förökning även morfologiskt samma utseende som denna. Mycelförökningar av subkulturen nr 5 (Fig. 141) reagerade även i flertalet observerade fall (62 av inalles 72) som ren Sved 4—1 (demarkationslinjer endast med Sval 6—36). I 7 fall var reaktionstypen obestämd i det att kraftiga demarkationslinjer bildades med Sval 6—36 och otydliga, ibland endast partiella med Sved 4—1. Några av dessa fall indikerade genom svag sektorbildning med något ökad mikrokonidiebildning mycelets blandkaraktär. I 3 fall slutligen reagerade överympningarna som ren Sval 6—36 (tydliga demarkationslinjer med Sved 4—1 och inga med Sval 6—36). Vegetativa förökningar från en av dessa sistnämnda

överympningar visade även morfologisk överensstämmelse med Sval 6—36. Mycelet i subkultur nr 5 innehöll följaktligen kärnor från båda föräldrabiotyperna.

Det inom grupp 1 (nr 1, 2, 3, 4, 6, 7: fig. 139) avvikande kulturutseendet från Sval 6—36 liksom de två i reaktionshänseende Sved 4—1-liknande kulturernas (nr 9, 10: fig. 40) avvikelser från denna sistnämnda biotyp kunna tolkas antingen som en verkan av att ėtt mindre antal av motpartens cellkärnor närvoro i hyferna, eller som ett utslag av plasmablandningen från de båda biotyperna. Av den morfologiska stabiliseringen vid vegetativa förökningar inom respektive grupper framgår emellertid, att denna antagna plasmaverkan var av övergående art.

Dessa iakttagelser synas vid första ögonkastet stå i strid mot resultaten från HARDERS välbekanta merogoniförsök med basidiomyceten *Pholiota mutabilis* (HARDER 1927). Resultaten från HARDERS försök rekapituleras i korthet. Genom kombination av två i flera avseenden starkt skilda haplonter från olika raser av denna art erhöll HARDER ett intermediärt dikaryotiskt mycel. Från detta isolerades genom operativa ingrepp enstaka bågceller, vilka innehöllo endast en kärna i en blandning av de båda rasernas cytoplasma. Dessa enstaka celler växte ut till haplontiska mycel, vilka efter någon tid stabiliserades i olika intermediära morfotyper, som till utseendet närmade sig antingen den ena eller den andra av utgångsraserna. Genom prövning fastställdes att cellkärnorna i samtliga dessa haplonter uteslutande tillhörde den ena utgångsrasen. Av försöken framgick vidare, att underlaget till åtskilliga fysiologiska karaktärer klart kunde lokaliseras till cellkärnorna och icke till cytoplasman. HARDER tolkade den morfologiska variationen som ett utslag av en bestående inverkan av plasmablandningens olika proportioner i de olika haplonterna.

En på detta sätt åstadkommen nybildning av olika morfotyper måste alltså förutsätta principiellt olikartad cytoplasma i de båda *Pholiota*raserna med möjligheter till rasegen reproduktion av morfologiska karaktärer verkställd genom genetiskt verkande enheter i plasman utanför kärnan. För att åstadkomma fullt stabila nya morfotyper synes det mig emellertid, som om ytterligare ett villkor måste vara uppfyllt nämligen, att de olika slagen av dessa genetiskt verkande enheter reproducera sig med exakt samma hastighet.

Det är klart, att de ovannämnda försöken med *S. trifoliorum* icke direkt kunna jämföras med HARDERS mera omfattande och exaktare försök, enär regeneraten av S. *trifoliorum* innehöllo flera cellkärnor. Av det faktum att de rena *Sclerotinia*biotyperna så småningom återbildades ur heterokaryotiska mycel framgår dock tydligt, att icke samma förutsättningar gälla för dessa två *Sclerotinia*biotyper som för de två *Pholiota*raserna. Det ligger närmast till hands att tolka iakttagelserna hos *Sclerotinia* på så sätt, att cellkärnorna utöva ett dominerande inflytande såväl på mycelets morfologiska karaktärer som på dess reaktionstyp. Med detta antagande motsäges icke möjligheten av, att självständiga cytoplasmatiska enheter med för mycelets allmänna fysiologi viktiga uppgifter finnas.

Iakttagelserna från *S. trifoliorum* synas i huvudsak stå i överensstämmelse med erfarenheterna från korsningsförsök med askomyceterna *Neurospora tetrasperma* och *N. sitophila* (DODGE 1928). Av dessa försök framgick bl. a. att inavel mellan *sitophila*-liknande bastardavkommor snabbt ledde till från den rena *N. sitophila* icke morfologiskt skiljbara typer. Fysiologiskt kvarstodo dock i F_3-generationen

vissa förändringar i form av ökad fertilitet gentemot *N. tetrasperma*. Dessa försök visa alltså, att *Neurospora*-cellkärnorna i varje fall ifråga om utformningen av morfologiska karaktärer trots blandningen av artfrämmande cytoplasma utöva ett dominerande inflytande på mycelet. Beträffande den ökade fertiliteten med *N. tetrasperma* synes det mig ej heller nödvändigt att som förklaring tillgripa en verkan av plasmablandningen. Denna ökade fertilitet bör lika enkelt kunna förklaras av det förhållandet, att cellkärnorna i de *sitophila*-liknande produkterna måste ha innehållit vissa *tetrasperma*gener.

Från de båda till groning lagda heterokaryotiska sklerotierna i det ovannämnda försöket med *S. trifoliorum* utvecklades tyvärr inga normala apothecier utan endast centimeterlånga skaft, vilka atrofierade. Ur det homokaryotiska sklerotiet erhölls ett normalt apothecium, vars sporer enligt analys tillhörde Sval 6—36 biotypen. Den ofullständiga apothecieutvecklingen från de två förstnämnda sklerotierna är emellertid icke något säkert tecken på att cellkärnorna i de båda föräldrabiotyperna äro oförenliga i så måtto, att de icke tillsammans förmå konstituera en normal dikaryofas, enär atrofiering av apothecieskaft vid andra tillfällen förekom inom rena biotyper som följd av rent modifikativa störningar i groningsmiljön. Upprepade försök att åstadkomma heterokaryotiska apothecier ur dessa båda biotyper ha dock hittills givit negativa resultat. Fem apothecier ur lika många sklerotier från olika kombinationskulturer ha analyserats. Samtliga fem voro homokaryotiska; fyra tillhörde biotypen Sved 4—1 och ett biotypen Sval 6—36. Reaktionstypen på sklerotierna fastställdes icke.

Försök nr 2/41. Föräldrabiotyper Sval 37—1 och Sval 40—1. Substrat näringsagar. Biotyperna voro morfologiskt lika men bildade demarkationslinjer med varandra. Stammarna Sval 37 och Sval 40 hade isolerats samtidigt cirka 10 m. från varandra på en klövervall i Svalöv. Ett apothecium från ett sklerotium ur en kombinationskultur analyserades. 10 sporer uttogos, av vilka 9 grodde. Samtliga ensporkulturer bildade demarkationslinjer med båda föräldrabiotyperna, men vissa bildade sinsemellan inga linjer. Resultat 5 nya biotyper representerade av 3, 2, 2, 1 och 1 individ (ensporkultur). Biotypvariationen var således av samma storleksordning som inom heterokaryotiska fältapothecier från Svalöv (jfr. tab. 9).

*

Resultaten från ovanstående korsningsförsök behandlas ytterligare i den allmänna diskussionen (sid. 128 och följande).

VIII. Cytologiska iakttagelser i vissa apothecier.

Spormognaden i aski försiggick i huvuddelen av det cytologiskt undersökta apotheciematerialet likformigt och simultant för samtliga åtta sporer inom varje askus. Alla sporerna voro alltså samtidigt antingen en-, två- eller fyrkärniga. Sedan fyrkärnstadiet uppnåtts visade sig den fortsatta jämna mognaden genom att sporerna antogo en m. e. m. kraftig men likformig, mörk färgton vid färgning med gentianaviolett eller hämatoxylin (Fig. 143, 144). Storleksskillnader mellan sporerna förekommo dock ej sällan, varvid antingen 4 voro större och 4 mindre eller 2 större än de 2 närmast liggande. Det sistnämnda fallet kan ses i askusen längst till höger i figur 143, där de 2 nedersta sporerna äro större än nummer 3 och 4 nedifrån räknat. De olikstora sporerna voro dock i dylika fall lika starkt färgade och såväl mognadsgraden som cellinnehållet föreföllo vara lika.

Ett undantag ifråga om jämn spormognad bildade två apothecier från en Svalövsstam, vilken tyvärr icke analyserades eller bibehölls i kultur, varför dessa apotheciers genetiska sammansättning förblev obekant. Sporerna i vissa aski i dessa fruktkroppar visade en markant skillnad så tillvida, att regelbundet 4 voro ljusare och 4 mörkare färgade (Fig. 145—148). Det har ej med säkerhet kunnat fastställas huruvida olikheterna mellan de ljusa och mörka sporerna enbart berodde på skillnader i mognadsgrad eller om även olikartat cellinnehåll var orsaken till färgskillnaderna. I de ljusa sporerna observerades i regel 4 kärnor; i de mörka var cellinnehållet så mörkfärgat, att inga inre strukturer kunde iakttagas. De bestämda talförhållandena 4+4 jämte den även regelbunda inbördes placeringen inom varje askus gav vid handen, att rena tillfälligheter t. ex. i form av gynnsammare näringsförhållanden för ett obestämt antal sporer under avgränsningen av sporcellväggarna och därmed följande snabbare mognad för dessa voro uteslutna. En möjlighet, som ej syntes orimlig, var, att skillnaderna i sporernas groningsmognad eller i arten av deras cellinnehåll voro genotypiskt betingade. Zygotkärnorna i de ifrågavarande aski skulle i så fall ha varit heterozygotiska och en reduktion av på spordifferentieringen inverkande faktorer skulle ha försiggått i någon av kärndelningarna. De ifrågavarande apothecierna skulle vidare ha varit heterokaryotiska, vilket av de i kapitel VII framlagda iakttagelserna i och för sig icke var osannolikt.

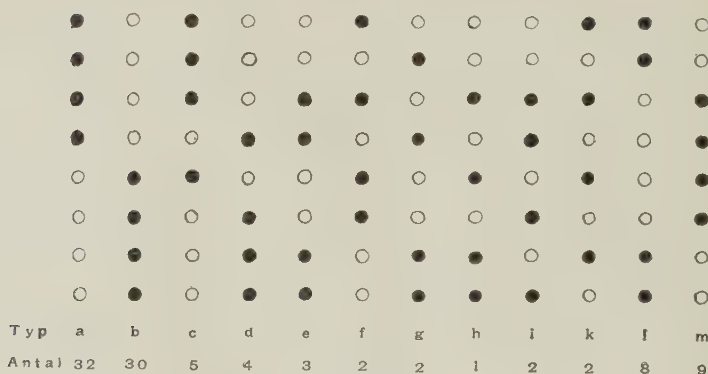
En annan möjlighet, vilken ej heller behöver stå i strid mot en faktorsklyvning under någon av kärndelningarna i askus, är den, att de två dotterkärnorna från 1. delningen eller deras avkomlingar delat sig med olika hastighet eller på olika tidpunkter. Så är t. ex. fallet hos *Bulgaria polymorpha* (GÄUMANN-DODGE 1928 p. 319). Hos denna art resulterar bristen på simultanitet i kärndelningarna i en utpräglad anisospori med stora och små sporer. Huruvida denna storleksskillnad beror på genotypiska skillnader

mellan de olika kärnorna är emellertid icke utrett. Anisospori av liknande slag förekommer enligt REHM (1896) även hos en del *Sclerotinia*arter (*S. Urnula* Weinm., *S. oxycocci* Woronin, *S. baccarum* Schröt.), vilka m. e. m. regelbundet bilda fyra små och fyra stora sporer. Dessa arter äro emellertid varken cytologiskt eller genetiskt undersökta.

För att undersöka huruvida ett verkligt samband existerade mellan heterokaryoti i apothecierna och skillnaderna i sporfärg i aski hos *S. trifoliorum*, utnyttjades i första hand den stabilt heterokaryotiska stammen Åk 1. Inalles undersöktes 7 apothecier (nr 1—7). Av denna stam lades fyra apothecier (nr 1—4) till sporkastning. Apothecierna fixerades cirka åtta timmar senare, sedan de kastat rikligt med sporer. Enligt följande sporanalyser voro alla fyra apothecierna heterokaryotiska. Samtliga visade dessutom vid cytologisk undersökning exakt samma bilder som de två ovan nämnda från Svalövsstammen, nämligen att vissa aski innehöllo 4 ljusa och 4 mörka sporer. I detta fall tillvaratogos och utlades till groning sklerotier från 10 olika ensporkulturer från ett av apothecierna (nr 1) i Åkarpsstammen, varigenom tillfälle erbjöds att fortsätta undersökningen på homokaryotiskt material i avkomman. Två apothecier (nr 5, 6) från två fertila biotyper bland dessa ensporkulturer undersöktes cytologiskt efter direkt fixering utan föregående sporkastning och analysering, vilket med hänsyn till att dessa apothecier voro homokaryotiska, ansågs onödigt. I dessa två apothecier var sporutvecklingen normal med jämn mognad. Ytterligare ett apothecium (nr 7), som härstammade från ett sklerotium ur en massaskosporkultur från ett av de förstnämnda heterokaryotiska apothecierna (nr 1) undersöktes cytologiskt, sedan det först kastat sporer. Sporanalysen av apothecium nr 7 visade, att det var heterokaryotiskt, och den cytologiska bilden var också densamma (4+4 i vissa aski) som i apothecierna nr 1—4.

Ur preparaten av de två ovannämnda Svalövsapothecierna och de fem heterokaryotiska Åkarpsapothecierna (nr 1—4, 7) utvaldes slumpmässigt 100 stycken aski med olikfärgade sporer. De olika sporkombinationernas frekvenser framgår av figur 142. Inga andra kombinationer än de i figur 142 avbildade iakttogos. Av en i fortsättningen framlagd utredning angående möjliga sporkombinationer vid en faktorsklyvning i någon av kärndelningarna i askus (Tab. 11) framgår, att alla de iakttagna bilderna äro möjliga vid en föregående reduktion i 1. eller 2. delningen. Vissa av dessa kombinationer (a, b, c, d, h) kunna endast uppkomma vid reduktion i de två första men ej i 3. delningen. Dessutom finnes ingen av de 28 för 3. delningen specifika kombinationerna, vilket i hög grad styrkte antagandet, att om en reduktion verkligen inträffat, denna skulle ha skett i 1. eller 2. delningen.

Situationen i denna specialundersökning var alltså vid denna tidpunkt följande. Å ena sidan funnos 5 säkert och 2 osäkert heterokaryotiska apo-



142

Fig. 142. Fördelningen av 100 iakttagna aski med olikdifferentierade sporer på olika sporkombinationer.

Verteilung von 100 beobachteten Aski mit verschieden differenzierten Sporen auf verschiedene Sporenkombinationen.

thecier med 4 ljusa och 4 mörka sporer i vissa aski, arrangerade på ett sätt som väl överensstämde med en faktorsklyvning under meiosen (deln. 1. och 2.) Å andra sidan funnos 2 säkert homokaryotiska och cirka 200 troligen homokaryotiska apothecier, vilka legat till grund för den tidigare cytologiska undersökningen (Kap. III) med likfärgade sporer i aski. Man kunde av dessa förhållanden vara frestad att sluta sig till, att ett säkert samband existerade mellan heterokaryoti och olikfärgade sporer i vissa aski. En systematisk undersökning av nytt apotheciematerial, vilket samtidigt analyserades på homo- eller heterokaryoti medelst sporkombinationer, visade emellertid, att så icke är fallet. 16 apothecier ur Svalövsstammarna nr 63—78 fixerades, sedan de kastat sporer för följande kulturanalys. Cytologisk undersökning visade, att 4 ljusa och 4 mörka sporer förekommo såväl i några homo- som i några heterokaryotiska apothecier. Detta tydde på att en yttre störning åstadkommit ojämnheterna i spordifferentieringen i dessa fruktkroppar, sannolikt i samband med avklippningen från sklerotierna och förflyttningen till de glasskålar, i vilka sporkastningen skedde. För att undersöka detta fixerades olika apothecier av biotypen Sval 6-44 dels direkt i groningskulturen dels vissa timmar efter avklippningen. De direkt och de efter en timma fixerade apothecierna innehöllo inga aski med olikfärgade sporer medan de apothecier, som fixerats 3, 6 och 8 timmar efter avklippningen hade flera aski med 4 ljusa och 4 mörka sporer. Detta visar, att en yttre störning var ansvarig för den ojämna spordifferentieringen.

Det är att märka, att de två homokaryotiska apothecierna ur Åk 1 (nr 5, 6) fixerades direkt utan föregående sporkastning, vilket kan förklara den

jämna spormognaden i dessa fruktkroppar. Vad beträffar de två förstnämnda Svalövsapothecierna med ojämn spormognad trots direkt fixering, är det möjligt, att någon med avklippningen jämförbar störning inträffat i groningsmiljön viss tid innan fixeringen skedde. Dessa båda apothecier voro f. ö., då de fixerades, äldre än övriga till detta ändamål använda fruktkroppar, och det är ej uteslutet, att en högre ålder medför ökad känslighet för askusstörningar av detta slag. Det sannolika sambandet mellan denna cytologiska störning och steriliteten i vissa ensporkulturer har tidigare framhållits (sid. 20).

Det är anmärkningsvärt, att denna avvikelse från den normala jämna spordifferentieringen var så beskaffad, att den resulterade i exakt samma sporkombinationer, som skulle uppstått, om en verklig faktorsklyvning förekommit i 1. eller 2. delningen. Detta tyder på att störningen endast inverkat på zygotkärnan eller dess dotterkärnor under delningarna eller under interfasen mellan delningarna. Det är vidare troligt, att företeelsen beror på en viss brist i den normala simultaniteten i så måtto, att avkomlingarna från den ena dotterkärnan utvecklas långsammare. Detta kan i sin tur medföra en förskjutning av det normala förhållandet mellan kärndelningarna och fördelningen av kondriosomer och extranukleära kroppar till de olika sporerna, vilkas utrustning av sistnämnda element i så fall blir olikartad. På grund av det ringa antalet iakttagbara kärndelningar i aski har det icke varit mig möjligt att uppnå klarhet på denna punkt. I ett apothecium, fixerat 6 timmar efter avklippningen iakttogos fem aski med till synes normalt simultana delningsfigurer i 3. delningen. Dessa kunna emellertid tillhöra icke störda askuskärnor och bevisa således ingenting. Intet fall av aski med samtidigt en- och tvåkärniga sporer iakttogs, däremot funnos stadier med 4 två- och 4 fyrkärniga sporer. I andra aski åter voro samtliga 8 sporer fyrkärniga.

I ett par apothecier ur en biotyp (Hög 1-1), vilka före fixeringen utsatts för kraftiga, systematiska störningar av annat slag än de ovannämnda (omväxlande torka och fuktighet) observerades 2 aski med icke simultana figurer i 3. avdelningen. Två intill varandra liggande delningsfigurer voro i båda fallen i telofas och de två andra i metafas. Aski i dessa apothecier utmärktes vidare av mycket oregelbunden spormognad med mörka och ljusa sporer. Förutom kombinationen 4+4 förekommo 5+3, 6+2 och 7+1. Störningarna voro i dessa fall uppenbarligen av mera genomgripande art och hade tydligen även inverkat på 4-kärnstadiet och 3. delningen.

Vissa av de i figurerna 142, 145—148 avbildade sporkombinationerna hos *S. trifoliorum* förete såväl i färg som i grupperingshänseende en slående likhet med några av DODGE's teoretiska avbildningar av den sexuella faktorsklyvningen hos *Neurospora sitophila* (DODGE 1927, SHEAR and DODGE 1927). Dessa DODGE's schematiska teckningar, i vilka sporer med sexuellt olika

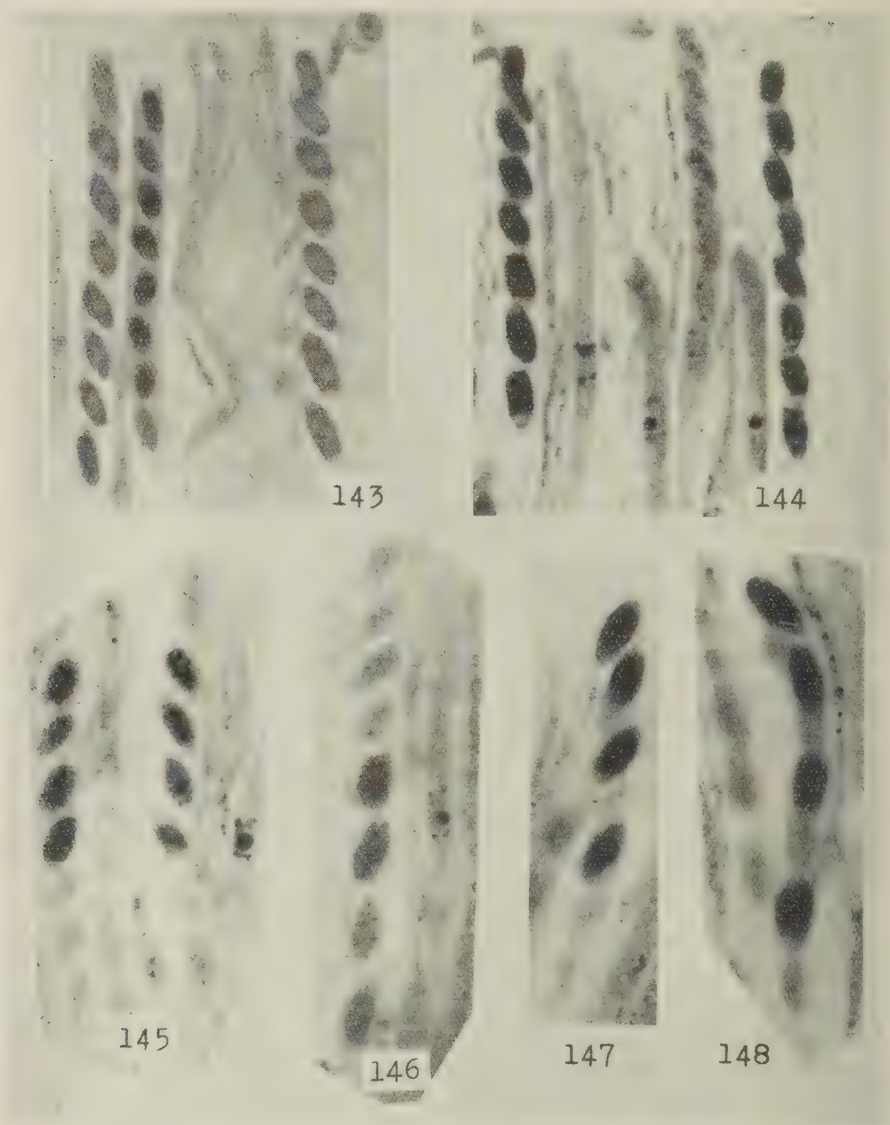


Fig. 143—148. Mikrofoto av normala och avvikande aski. 143, 144 Normala. 145—148 olika typer av sporkombinationer med 4 mörka och 4 ljusa sporer i askus. 145 Till vänster 4 mörka + 4 ljusa; till höger 2 ljusa + 4 mörka + 2 ljusa. 146 4 ljusa + 4 mörka. 147 3 mörka + 1 ljus + 1 mörk + 3 ljusa. 148 Varannan mörk och varannan ljus. 144 Hämatoxylin, övriga gentianaviolett.

Mikrophoto von normalen und abweichenden Aski. 143, 144 Normal. 145—148 verschiedene Typen aus Sporenkombinationen mit 4 dunklen und 4 hellen Sporen im Askus. 145 Links 4 dunkle + 4 helle; rechts 2 helle + 4 dunkle + 2 helle; 146 4 helle und 4 dunkle. 147 3 dunkle + 1 helle Spore + 1 dunkel + 3 helle. 148 Jede zweite hell und dunkel. 144 Hämatoxylin, übrige Gentianaviolett.

kärnor framställts i svart och vitt, ha senare kommenterats och utvidgats av KNIEP (1929). Enligt DODGE's cytologiska undersökningar ligga spolarna vid kärnledningarna i askus hos *N. sitophila* alltid så orienterade, att systerkärnor städse komma att ligga intill varandra. Härav följer att endast ett begränsat antal kombinationer ifråga om den inbördes placeringen av sexuellt olika kärnor (sporer) kan ifrågakomma. Vid en antagen reduktion av de sexuella faktorerna i 1., 2. eller 3. delningen äro sålunda endast 2, 4 respektive 16 bestämda kombinationer möjliga. Detta teoretiskt uppgjorda schema kan givetvis även tillämpas på andra faktorsklyvningar hos denna svamp. Genetisk analys visade reduktion i 2. avdelningen av de sexuella faktorerna (WILCOX 1928, LINDEGREN 1932) och reduktion av andra faktorer i 1. eller 2. delningarna (LINDEGREN 1933, 1934).

Ehuru den ovannämnda företeelsen med 4 mörka och 4 ljusa sporer hos *S. trifoliorum* icke är uttryck för en faktorsklyvning, visar den dock, som ovan påpekats, samma bilder som en dylik skulle ha givit. Då vidare verkliga ehuru icke cytologiskt påvisbara faktorsklyvningar förekomma hos denna art (Kap. VI, VII) kan det vara berättigat att i korthet beröra de möjliga sporkombinationerna vid reduktion i de olika kärndelningarna.

Förutom de ovannämnda sammanlagt 22 typerna hos *N. sitophila* förekomma sålunda hos *S. trifoliorum* åtskilliga kombinationer (*c, d, f, g, h, i,* i Fig. 142 samt Fig. 147), vilka icke kunna inrangeras i det Dodge-Kniepska schemat. Uppkomsten av dessa avvikande typer hos *S. trifoliorum* kan emellertid lätt förklaras med ledning av det tidigare (sid. 54: fig. 60, 61) påpekade förhållandet, att kärnspolarna vid de två sista delningarna i askus ibland äro så orienterade, att systerkärnor skiljas åt av icke-systerkärnor. Genom detta förhållande ökas antalet teoretiskt möjliga sporkombinationer avsevärt. En beräkning ger vid handen, att vid en antagen faktorsklyvning i 1. delningen 14 i stället för 2 kombinationer är tänkbar; i 2. delningen 22 i stället för 4 och i 3. delningen 42 i stället för 16. En schematisk framställning av alla dessa typer har av utrymmesskäl icke medtagits här. Möjligheterna att med ledning av en viss föreliggande kombination sluta sig till i vilken delning faktorsklyvningen skett, äro emellertid starkt begränsade av det förhållandet, att i en del fall samma kombinationer kunna uppkomma oberoende av i vilken delning reduktionen skett. Sålunda kunna exempelvis alla de 14 i 1. delningen möjliga typerna även bildas vid reduktion i 2. delningen om interferens i form av platsbyte mellan syster- och icke-systerkärnor förekommer. Tabell 11 ger en översikt över kombinationsfördelningen.

Som komplettering till tabell 11 må följande uppgifter lämnas. Det sammanlagda antalet olika kombinationer är 50. Av de 14 för 1. och 2. delningarna gemensamma typerna kunna 6 förekomma endast vid reduktion i någon av dessa delningar och icke i 3. delningen. Vidare utgör det för-

Tabell 11. *Sporkombinationer i askus vid en monofaktoriell klyvning i 1., 2. eller 3. delningen.*

Sporenkombinationen im Askus bei einer monofaktoriellen Spaltung in der 1., 2. oder 3. Teilung.

Reduktion Reduktion	Antal kombinationer				
	Total Total	Gemensamma för delning Gemeinsam für Teilung			Specifika för delningen Spezifisch für die Teilung
		1 och 2	1 och 3	2 och 3	
1. deln. 1. Teilung	14	14	8	—	0
2. deln. 2. Teilung	22	14	—	14	2
3. deln. 3. Teilung	42	—	8	14	28

Hållandet, att icke mindre än 28 för 3. delningen specifika typer finnas, ett visst underlag vid bedömningen av eventuella framtida genetiska sporundersökningar med förbättrad mikromanipulatorteknik. Om ingen av dessa 28 kombinationer är representerad i ett större antal analyserade aski, kan man sålunda med stor säkerhet sluta sig till att reduktionen av de vid en sådan undersökning aktuella faktorerna icke skett i 3. delningen.

IX. Diskussion.

Cytologiska iakttagelser. Om man bortser från den ovanligt välutvecklade dikaryotiska fas, som karakteriserar det undersökta *Sclerotinia*materialet, företer det i stort sett samma cytologiska bild som flertalet av de i detta avseende kända högre askomyceterna. Sålunda förekommer endast en kärnsammansmältning, nämligen i den unga askusen, och en därpå följande normal askomycetmeios. Ingen ytterligare reduktion av kromosomtalet (brachymeios) finnes i tredje delningen i askus. En företeelse, som emellertid förtjänar att närmare diskuteras, är förekomsten av det utpräglade diffusa stadiet under den första meiotiska profasen. Detta diffusa stadium, som har sin grund i karyotinets minskade mottaglighet för basiska färgämnen, förefaller att döma av en del äldre undersökningar vara ett tämligen allmänt förekommande skede i askomycetmeiosen. GUILLERMOND, som studerat ett stort antal arter cytologiskt, framhåller särskilt (1905) att endast två arter (*Humaria rutilans* och *Peziza catinus*) uppvisa ett avvikande för-

hållande med bibehållen basikromatisk färgbarhet under hela profasen. Hos båda dessa, i synnerhet den förstnämnda, äro kärnorna mera karyotinrika än i övriga fall. Även hos *Ascobolus stercorarius*, som likaledes utmärkes av stor karyotinmängd i den primära askuskärnan, är det diffusa stadiet icke utpräglat (Björling 1941). Möjligen förhålla sig även erysiphacéerna likartat. I senare cytologiska undersökningar synes denna detalj ha undandragit sig uppmärksamheten och iakttagelserna ha av andra orsaker (brachymeiosfrågan) huvudsakligen koncentrerats kring senare och mera distinkt framträdande stadier i meiosen, framförallt kromosomtalet i de olika delningarna. Guillermond (1903, 1904, 1905) sökte förklara den minskade basikromatiska färgbarheten i tidigare profasstadier genom att sätta den i samband med det hos vissa arter, i synnerhet *Galactinia succosa*, iakttagna uppträdandet av basofila kroppar utanför kärnmembranen. Detta skulle alltså förutsätta en m. e. m. fullständig utsöndring i cytoplasman av kärnans basikromatiska substans med undantag av nucleolen, som hela tiden bibehåller sin färgbarhet. Maire, som även studerat dessa förhållanden, i synnerhet hos *Galactinia succosa* (Maire 1903, 1905) fann, förutom små basofila korn omedelbart utanför zygotkärnan i askus, andra kromatiska kroppar av olika typer, av vilka åtminstone en del antogos vara direkta sekretionsprodukter från kärnan, dock utan att detta sattes i samband med det diffusa stadiets uppkomst. Hos många arter är emellertid förekomsten av basofila extranukleära kroppar i askus mycket obetydlig eller ingen alls. De extranukleära kropparna hos de i detta arbete undersökta *Sclerotinia*arterna äro tydligen av annan art än de ovannämnda basofila kornen och kunna svårligen sättas i samband med och enbart förklaras av en utsöndring av basikromatiskt material under den första meiotiska profasen. Ett dylikt antagande motsäges bland annat av deras regelbundna uppträdande i två- och fyrkärnstadiet i askus, vidare utanför de vegetativa sporkärnorna och i de askogena hyferna.

För att förklara det diffusa stadiets uppkomst är det enligt min mening icke nödvändigt att förutsätta en utstötning av materia från zygotkärnan under profasen. Kemiska förändringar inom själva kärnan kunna i och för sig med bibehållen karyotinmängd vara en tillräcklig orsak till en övergående minskning i färgbarheten. Dessa förutsatta kemiska förändringar kunna vara betingade av att zygotkärnan i askus förutom sin generativa även har en avsevärd vegetativ uppgift att fylla. En jämförelse med fanerogammeiosens cellmiljö (PMC, EMC) visar, att zygotkärnan i askus under profasen i samband med askusens enorma och i regel snabba tillväxt har en mera påkostande metabolisk kontrollverksamhet på sin lott än motsvarande kärnor hos fanerogamerna, (respektive meiocytkärnor). I detta avseende företer askomycetmeiosen snarare vissa likheter med den animala meiocytutvecklingen, i synnerhet ovogenesen, där ett mycket karakteristiskt

diffust stadium förekommer under pachytän och diplotän i samband med den avsevärda tillväxten och differentieringen av ägget (WILSON 1928). — Att motsvarande stadium hos askomyceterna är i olika hög grad utpräglat hos olika arter torde kunna förklaras av en del olikheter i kärnstruktur och askusutveckling. Hos de undersökta *Sclerotinia*arterna befinner sig den relativt karyotinfattiga primära askuskärnan i profas ända tills askusen nått sin definitiva storlek och är således under hela denna tid metaboliskt verksam. Hos den relativt karyotinrikare *Ascobolus stercorarius* försiggår samtliga tre kärndelningar vid en askuslängd, som knappt motsvarar hälften av den definitiva, vilket kan vara en bidragande orsak till, att det diffusa stadiet ej är så utpräglat hos denna art. Zygotkärnan hos *Humaria rutilans* å andra sidan delas icke förrän askusen uppnått sin i det närmaste slutgiltiga storlek, men denna art intager tillsvidare, som tidigare påpekats, en särställning genom sina för askomycetförhållanden ovanligt stora och karyotinrika kärnor. Erysiphacéernas askusutveckling slutligen avviker från de i regel mera välkända köttiga discomyceternas bl. a. däri att den sker avsevärt långsammare. Enligt undersökningar, som jag utfört på *Erysiphe graminis*, befinner sig den primära askuskärnan i pachytänstadiet under minst två månader och under denna tid försiggår ingen märkbar vegetativ tillväxt i askus, vilken redan tidigare uppnått sin i det närmaste slutgiltiga storlek.

Steriliteten. Det har tidigare (Kap II, 3) med en viss sannolikhet kunnat påvisas, att den ifrågakommande typen av sterilitet inom genetiskt enhetligt spormaterial framkallades av yttre omständigheter, troligen bestående i en störning av kärndelningarna i askus vid dekapiteringen eller skakningen av apothecierna då dessa togos från groningskulturerna för att läggas till sporkastning. Cytologiska iakttagelser i dylika apothecier visade en ojämnhet i spordifferentieringen, vilken kunde tolkas som en efterverkan av en dylik störning. Vari den verkliga skillnaden mellan de fertila och de, åtminstone till en början lika vitala och sklerotiebildande, sterila avkomlingarna från ett sådant apothecium ligger, har däremot icke kunnat tillfredsställande förklaras. Resultaten från jämförande försök visade att steriliteten och den därmed korrelerade tilltagande degenerationen i kultur var av bestående art och att följaktligen störningen i moderapotheciet på ett avgörande sätt ingripit i gestaltningen av de sporer, som sedermera bildade sterila mycel. Detta kan tänkas ske antingen genom en förändring av de sterila sporkärnornas struktur (exempelvis genom kromosomaberrationer) eller genom en ojämn utrustning av vissa cytoplasmatiska organ (kondriosomer, extranukleära kroppar) i de ifrågavarande sporerna. Ehuru exakta bevis för vilken av dessa möjligheter, som verkligen är för handen, svårligen kunna erhållas ur det föreliggande materialet tala dock flera fakta för att orsaken till steriliteten icke ligger i förändringar i kärnstrukturen. Detta

skulle med hänsyn till störningens lindriga art förutsätta en mycket stor labilitet hos kärnorna, vilken i det relativt omfattande materialet borde ha manifesterat sig genom en avsevärd frekvens av säkra mutationer av olika typer inom sporavkommorna. Så är emellertid icke fallet. De likartade degenerationssymptomen inom väsentligt olika biotyper skulle vidare under denna förutsättning grunda sig på likartade och bestämda störningar i kärnstrukturen, vilket synes mindre sannolikt. Även det förhållandet, att sterila och fertila avkommor ur samma biotyp icke bildade demarkationslinjer med varandra, samt uppkomsten av normalt fertila korsningsapothecier ur sterila och fertila ensporkulturer från olika biotyper talar mot antagandet om förändringar i kärnstrukturen.

Den andra möjligheten, en ojämn fördelning av kondriosomer eller extranukleära kroppar till de olikdifferentierade sporerna, är tänkbar, ehuru cytologiska bevis härför icke föreligga. Den yttre störningen skulle i så fall orsaka en rubbning i det normala, harmoniska förhållandet mellan de egentliga kärndelningarna och fördelningen av dessa cytoplasmatiska kroppar. Sporer med en bristfällig eller abnorm utrustning av de sistnämnda kropparna skulle enligt detta antagande ge upphov till sterila mycel. I detta sammanhang bör det påpekas, att dessa antaganden anknyta till och i vissa avseenden komplettera den nyligen av WINGE uppställda hypotesen om en ojämn kondriosomfördelning såsom möjlig orsak till letalitet vid direkt diploidisering i vissa jästsvampmycel (WINGE och LAUSTSEN 1940).

Av denna diskussion torde framgå, att jag icke betraktar de sterila mycelen som mutationer i egentlig mening. Å andra sidan kunna de icke utan vidare betecknas som vanliga modifikationer utan måste således inrangeras i den osäkra och svårdefinierbara gruppen »dauermodifikationer». — Morfologiska och fysiologiska mycelvarianter med större eller mindre vegetativ konstans ha i mycket stort antal under olika benämningar (sektor, saltation, mutation) beskrivits i den mykologiska litteraturen (HÆNICKE 1916, CHODAT 1926, CHRISTENSEN och STAKMAN 1926, BARNES 1935 m. fl.). En del av dessa varianter voro spontana, andra inducerade. Ehuru det icke genom försök påvisats, att dessa varianter äro ärftliga torde det enligt KNIEP (1929) i en del fall vara frågan om verkliga mutationer. Några andra fall i synnerhet beträffande *Fungi imperfecti* kunna sannolikt förklaras med att de bestående förändringarna uppkommit genom förskjutningar i proportionen mellan genotypiskt olika cellkärnor i heterokaryotiska mycel (»dual phenomenon» HANSEN 1938). De övriga måste alltså tills vidare klassificeras som tillfälliga modifikationer eller »dauermodifikationer». Det är möjligt, att iakttagelserna beträffande uppkomsten av sterila mycel hos *S. trifoliorum* kunna bidraga till en vidgad förståelse för mekanismen vid bildningen av en del dylika till synes spontana varianter hos andra svampar.

Slutligen må det framhållas, att den ifrågakommande apotheciestörningen, vars efterverkan utgjordes av ojämn spormognad och sterilitet hos vissa sporavkommor, var av så pass lindrig art, att det kan vara berättigat att antaga, att även i naturen liknande störningar med liknande efterverkningar förekomma. Härigenom kunna vid undersökningar av fältmaterial, som isolerats under ej närmare kända omständigheter, lätt felslut göras, i det att även genetiskt enhetligt material kan giva en falsk bild av heterokaryoti.

Resultaten från korsningsförsöken. Det är anmärkningsvärt, att i intet av dessa försök någon av de rena föräldrabiotyperna uppträdde i sporavkommorna. Vid en slumpmässig fördelning av utgångsbiotypernas cellkärnor i den dikaryotiska fasen och under förutsättning av lika stor tillväxthastighet hos autogama och allogama askogena hyfer skulle man i sporavkomman från heterokaryotiska apothecier vänta sig vardera föräldrabiotypen uppträda i en frekvens av minst 25 %. De över 25 % liggande fallen skulle härröra från utklyvningar av de rena föräldrabiotyperna från heterozygotiska primära askuskärnor. Frekvensen dylika fall avtager emellertid som bekant mycket snabbt med växande antal gendifferenser och skulle sannolikt i flertalet av de här ifrågakommande försöken icke vara märkbar. Individantalet i avkommorna från korsningsapothecierna var visserligen icke så omfattande, men dock tillräckligt stort för att påvisa en säker avvikelse från det ovan skisserade schemat med denna avsevärda reproduktion av föräldrabiotyperna. Tydligen förelåg i dessa korsningsprodukter en heterosiseffekt av ett eller annat slag antingen i form av certation mellan allogama och autogama hyfer till de förras fördel eller däri att autogama askogena hyfer överhuvudtaget icke bildades i heterokaryotiska apothecier. Det är möjligt, att omfattande cytogenetiska undersökningar av korsningar mellan noggrant kända biotyper skulle kunna giva besked om, i vilken av dessa former effekten yttrar sig. Betydelsen av denna heterosiseffekt ligger framför allt däri att den i väsentlig grad bidrager till att öka variationen inom arten.

Variationen i allmänhet. Det har tidigare framför allt genom Papes och Nicolaisens et al. omfattande undersökningar klarlagts, att *Sclerotinia trifoliorum* i kulturhänseende företer en mycket stor modifikativ variabilitet om den odlas på olika substrat, vid olika temperaturer, pH eller kolsyrekoncentrationer. Genom de föreliggande försöken har det visats, att även på samma substrat stora modifikativa variationer kunna uppstå även vid relativt obetydliga förändringar i odlingstekniken. Ett noggrant aktgivande på substratmängd och ympmaterialets beskaffenhet nedbringar emellertid denna variation inom biotypen till en obetydlighet. Av ett visst intresse är vidare konstaterandet, att det substrat, på vilket sklerotierna bildas, modifikativt påverkar en så pass stabil karaktär som askosporstorleken.

Beträffande den av genotypiska skillnader betingade variationen, kan det med stöd av de föreliggande undersökningarna konstateras, att ofta endast obetydliga och svårdefinierbara skillnader i kulturutseende förelågo mellan olika biotyper. I flera fall, även sådana då materialet härstammade från olika värdväxter, kunde överhuvudtaget inga morfologiska skillnader noteras mellan biotyper, som enligt andra försök voro fysiologiskt olika. Skillnaderna i askosporstorlek mellan biotyperna voro i vissa fall tydliga och signifikativa, i andra fall obetydliga och statistiskt osäkra. En framkomlig väg att få en detaljerad inblick i den genotypiskt betingade variationen, erbjöds genom biotypernas fysiologiska olikheter, vilka manifesterade sig genom en markant ökning i mikrokonidiebildningen vid samodling av genotypiskt skilda mycel. Härigenom uppnåddes utan svårighet en differentiering även mellan morfologiskt icke skiljbara biotyper. Resultaten från dylika analyser visade, att variationen är mycket stor; olika orter inom samma eller skilda länder representerades sålunda av olika biotyper. Även på samma lokal t. ex. inom ett klöverfält var variationen avsevärd i det att varje individ ofta representerade en särskild biotyp. I vissa fall isolerades från samma fält två eller flera individ tillhörande samma reaktionstyp och enligt den uppställda arbetshypotesen sålunda även samma biotyp. Det bör dock i detta sammanhang påpekas, att de detaljerade lokalanlyserna utförts på material från Skåne, där man av flera orsaker kan förutsätta, att heterogeniteten är större än i vissa övriga delar av Sverige. Särskilt i södra och västra Skåne med sitt intensiva och i geografiskt avseende så gott som kontinuerliga åkerbruk, måste möjligheterna för en blandning av olika biotyper genom askosporspridning med vinden från ett fält till ett annat och från en ort till en annan vara större än på flertalet andra platser i landet. Härtill kommer spridningen med sklerotier i utsädet. Framförallt bör detta gälla de olika växtförädlingsanstalterna, där ofta utsäde från vitt skilda orter odlas samtidigt på begränsade arealer. Att sklerotier av *S. trifoliorum* ofta medfölja fröet har nämligen tidigare vid flera tillfällen påvisats (Beretning från Statsanstalten Dansk Frökontrol 1893—1903, Troussowa 1927, Pape 1937 m. fl.)

På så sätt införda främmande biotyper med avvikande genuppsättning kunna sannolikt, även om de från början endast äro företrädda av enstaka individ, genom korsningar med tidigare förhandenvarande biotyper snabbt öka variationen på en viss ort. Detta antagande bekräftas även av de utförda korsningsförsöken, där variationen i sporavkommorna från kombinationsprodukter mellan biotyper från Svalöv och Weibullsholm (sid. 112) var avsevärt större än variationen i sporavkommorna från heterokaryotiska fält- eller syntetiskt framställda korsningsapothecier (sid. 117) med lokala Svalövsbiotyper som utgångsmaterial.

Ett av de undersökta fälten i Dalbytrakten (grupp 5, sid. 109), som repre-

senterade normal landsbygd utan anknytning till någon växtförädlingsanstalt, och där man alltså eventuellt kunde förvänta en något enhetligare sammansättning av *Sclerotinia*populationen, uppvisade dock minst lika stor biotyprikedom som fälten på Svalöv. Utsädet till Dalbyfältet härstammade dock enligt upplysning från icke mindre än tre olika orter, vilket kan bidraga till att förklara den stora variationen. Ett annat fält i Hörbytrakten med enhetligt utsäde (grupp 6 sid. 109) företedde betydligt mindre variation med så mycket som 5 till reaktionstypen identiska individ av 7 undersökta. Det är därför mycket möjligt, att en analys av *Sclerotinia*populationerna på andra orter i landet i synnerhet m. e. m. isolerade med egen fröproduktion skulle visa en ännu större enhetlighet än i sistnämnda fallet.

En viktig faktor, som bidrager till att vidmakthålla *Sclerotinia*beståndet på en viss ort, är vidare det av NILSSON-LEISSNER (1934, 1935) påvisade förhållandet, att svampen utom klöver och en del andra odlade leguminoser även angriper och genomgår hela sin utvecklingscykel på åtskilliga vilda växter tillhörande olika familjer, av vilka flera uppträda som ogräs i klövervallarna.

Slutanmärkningar. Resultaten från de föreliggande undersökningarna bidraga till att belysa en för resistensförädlingen av klöver och övriga baljväxter mot klöverröta viktig fråga nämligen variationen mellan de biotypgrupper, vilka kunna klassificeras som sjukdomsalstrarens patogena (fysiologiska) raser. Trots att de företagna analyserna ännu icke direkt beröra de patogena egenskapernas variabilitet, så är det ur genetisk synpunkt uppenbart, att mellan de större eller mindre grupper av *Sclerotinia*biotyper, vilka, beroende på testsortimentets kvalitet och kvantitet, kunna identifieras som enskilda patogena raser, principiellt samma variationsförhållanden gälla som mellan enskilda biotyper. Då det av de olika ovannämnda försöken med full säkerhet framgår, att nya biotyper kunna bildas genom korsningar, är det likaledes klart, att nya raser med avvikande patogena egenskaper kunna uppkomma på samma sätt. Genom detta fastställande har jag kommit till en uppfattning, som är principiellt skild från det nyligen av NICOLAISEN et al. anförda, på ett mindre antal negativa korsningsresultat grundade uttalandet, enligt vilket man icke behöver räkna med en dylik nybildning av patogena raser hos *S. trifoliorum* (l. c. 1940 p. 621—622: »Diese Tatsache stellt einen wesentlichen Vorteil für die Resistenzzüchtung gegen den Kleekrebs dar, da mit der Bildung neuer Formen des Erregers durch Kombination nicht gerechnet zu werden braucht»).

Trots att resistensförädlingsproblemet faller utanför ramen av den föreliggande undersökningen, kan det icke undvikas att ägna ytterligare några ord åt denna viktiga fråga. Det förhållandet, att nya patogena raser kunna bildas genom korsningar av tidigare förhandenvarande, försvårar givetvis

den redan förut komplicerade och ännu i sin begynnelse varande resistensförädlingen av klöver och andra baljväxter mot *S. trifoliorum*. Härmed är givetvis icke sagt att en dylik resistensförädling skulle vara omöjlig eller i praktiken outförbar. Tvärtom behöver jag i detta sammanhang endast hänvisa till de aktningsvärda förädlingsresultat i form av mot klöverröta högresistenta klöverstammar som redan uppnåtts vid olika svenska växtförädlingsanstalter (SYLVÉN 1936, NILSSON-LEISSNER and NILSSON 1940, GELIN och SCHWANBOM 1941). Utgångsmaterialet vid dessa förädlingsarbeten har utgjorts av och utgöres fortfarande av en del därtill lämpade lokalstammar särskilt av rödklöver, vilka uppkommit genom det naturliga urvalets resistensförädlande inverkan. Det synes vidare troligt, att även en del av de aktuella, principiellt likartade förädlingsarbetena i detta syfte, i vilka urvalet av resistenta plantor genom systematiska infektionsförsök i stor skala ytterligare skärpes, även skola leda till mot sjukdomen högresistenta klöverstammar.

Uppkomsten och betydelsen av de för förädlingen värdefulla lokalstammarna av klöver belyses i vissa avseenden ytterligare genom den utvidgade kännedomen om sjukdomsalstrarens biologi, som det föreliggande arbetet bidragit med. Lokalstammarna ha tydligen genom selektion så småningom uppnått en genomsnittligt hög resistens mot samtliga på ifrågavarande lokaler befintliga patogena raser av *S. trifoliorum*. För att få en ökad kännedom om de möjligheter, som stå den framtida resistensförädlingen till buds, synes det mig särskilt viktigt, att i första hand söka klarlägga denna såväl i praktiken som i försök iakttagna resistens natur.

Av de föreliggande undersökningarna framgår att arten *Sclerotinia trifoliorum* består av en mängd fysiologiskt olika, men ofta morfologiskt svårskiljbara eller lika biotyper. Biotyperna äro självfertila och i regel homokaryotiska. Förutom dessa rena linjer, vilka synas utgöra huvudmassan i populationerna, förekomma heterokaryotiska sklerotier och apothecier i varierande frekvens. Den regelbundna kärn- och celldelningsmekanismen i dikaryofasen före den sexuella reproduktionen jämte en viss heterosiseffekt i heterokaryotiska apothecier äro medel att öka formrikedomen i avkomman från korsningsprodukter, varigenom den avsevärda variationen inom arten vidmakthålles.

ZUSAMMENFASSUNG.

Titel der Mitteilung: *Untersuchungen über den Kleekrebs. II. Studien über Entwicklungsgeschichte und Variation von Sclerotinia trifoliorum.*

In der Einleitung wird hervorgehoben, dass der Zweck der vorliegenden Untersuchungen ist, einen Teil der bisher unvollständig oder gar nicht bekannten Abschnitte in der Biologie von *Sclerotinia trifoliorum* Erikss. klarzulegen, wodurch man sicherere Ausgangspunkte für Resistenzuntersuchungen erhalten kann. Das Material und die Methodik werden behandelt in Kap. I, die Entwicklungsgeschichte in Kap. II—V und die Variation hauptsächlich in Kap. VI—VIII.

Das Pilzmaterial stammte aus Schweden, Dänemark und U. S. A.; in der Hauptsache aus Schonen, Schwedens südlichster Provinz (Tab. 1). Das Material wurde vom Kleefeld isoliert vor allem in Form von Sclerotien, in einigen Fällen als Apothecien. Vegetative Kulturvermehrungen derselben werden im folgenden als Stämmen bezeichnet; Einzelsporenkulturen mit Zellkernen derselben genotypischen Konstitution als Biotypen. Jene wurden in der Regel mit der Nadel aus Sporenverbreitungen auf Agarplatten herausgenommen; in gewissen Fällen wurden sie direkt aus den Aski mit dem Mikromanipulator (Zeiss, Mipu) isoliert. Bei Infektionsversuchen wurde (ausser in einem Falle, Tab. 7) genetisch einheitliches Kleematerial verwendet, d. h. Pflanzen aus bestimmten Rotkleeklonen. Für die cytologischen Studien wurde fixiert in Bouin und 2 BD; von den letztgenannten Fixierungsflüssigkeit wurde eine halbe Konzentration verwendet für fleischige und ganze für mehr oder weniger sclerotisierte Stadien. Färbungen wurden ausgeführt mit Hämatoxylin, Gentianaviolett oder gemäss Feulgens Nuklealreaktion. Spezialfärbung von Chondriosomen wurde laut Benda und Regaud F. ausgeführt.

Die Entwicklungsgeschichte.

Sclerotien. Die Art der Bildung und die Anatomie (Fig. 1, 2) stimmt im grossen und ganzen überein mit dem entsprechenden Organ von *Sclerotinia sclerotiorum* (de Bary 1884 und andere). Keimungsuntersuchungen bewiesen die ausschlaggebende Einwirkung des Milieus auf die Apothecienbildung. Bei den Temperaturen 5±2°, 10±2°, 15±2° und 20±2° erhielt man Apothecien, aber nicht bei 0±2° und 30±0°. Bei 25±0° wurden Apotheciensteile, aber keine normalen Fruchtscheiben ausgebildet. Was den Grad der

Frühzeitigkeit betrifft, so wurden nur unbedeutende und in der Regel unsichere Unterschide zwischen den Stämmen notiert. Gewisse bestimmte und augenscheinlich genotypisch bedingte Unterschiede von 3—6 Tagen wurden jedoch bei wiederholten Versuchen zwischen einigen Stämmen beobachtet. Diese und andere Beobachtungen bestätigen die Untersuchungen von Nicolaisen et al. (1940) und Henson and Valleau (1940). Der formenbildende Einfluss des Lichtes geht aus den Fig. 3—7 hervor. Bei direkter Sonnenbestrahlung während mehr als 2 Stunden per Tag wurde die Apotheeienbildung zeitweilig unterdrückt. Dies scheint unabhängig von der temporären Temperatursteigerung zu geschehen. – Gewisse Stämme und Biotypen waren steril. Auch in Sporennachkommen in reinen Linien trat Sterilität auf in einer Häufigkeit von 20—30 % (Tab. 2). Es wurde festgestellt, dass die Ursache dafür herrührte von einer Nachwirkung einer Störung den Apothecien, wenn sie zum Sporenstäuben abgeschnitten wurden. Nachkommen der Sporen, die in den Stunden, welche auf die Störung zunächst folgten, vom Apothecium ausgeschleudert wurden, waren sämtlich fertil; nach 12—24 Stunden trat partielle Sterilität auf (Tab. 3). Die Nachwirkungen dieser Störung zeigten sich auch cytologisch in Gestalt von ungleichmässiger Sporendifferenzierung innerhalb gewisser Aski (Fig. 145–148).

Apothecien. Die morphologische und histologische Entwicklung des Apothecienstiels geht aus Fig. 8—13 hervor. Die Stiele von unterirdischen Sclerotien wachsen mehr oder weniger gerade in Richtung der Bodenoberfläche. Diese Sachlage scheint eigentümlicherweise nicht eine Folge von negativem Geotropismus zu sein, da die Stiele von auf der Erdoberfläche liegenden Sclerotien bei Dunkelheit nicht auf diese Art reagierten, sondern in verschiedenen Richtungen wuchsen mehr oder weniger winkelrecht zur Sclerotienoberfläche (Fig. 3). Es ist möglich, dass die Richtung des Wachsens der unterirdischen Stiele im Verhältnis zur Erdoberfläche bestimmt wird von ihrem Sauerstoffbedarf (positiver Aerotropismus). Gemäss verschiedenen Autoren ist *S. trifoliorum* in allen Entwicklungsstadien stark sauerstoffbedürftig (Rehm 1872, Wadham 1925, Pohjakallio 1940 usw.). Die Apothecienstiele sind positiv phototropisch und die Länge des oberhalb der Erdoberfläche befindlichen Stiels wird von den herrschenden Lichtverhältnissen bestimmt. – Differenzierte Sexualorgane fehlen. Die dikaryotische Phase wird an verschiedenen Stellen gebildet im zentralen Gewebe des Stieles. Aus ascogonialen Zellen grösserer Breite als der der umgebenden vegetativen wachsen die ascogenen Hyphen hervor. Diese sind bemerkenswert gut entwickelt und bestehen aus zwei Arten, aus primären ohne Schnallen (Fig. 17—22), sekundären mit Schnallen (Fig. 23—28). Der Übergang von den ersteren zu den letzteren geht ohne merkbare Volumenveränderungen in Zellen oder Kernen vor sich. In den sekundären ascogenen Hyphen werden Schnallen angelegt als laterale Ausbuchtungen (Fig. 23, 25);

der Vorgang bei Kern- und Zellteilungen ist genau der gleiche wie bei den höheren Autobasidiomyceten. Reichliche Verzweigung kommt bei den sekundären, aber nicht bei den primären Hyphen vor. — Bei einem Vergleich zwischen verschiedenen Theorien betreffend die Funktion der Ascomycetenhaken und Basidiomycetenschnallen (LOHWAG 1927, MARTENS 1932, GREIS 1938) wird unbedingt GREIS' Theorie als die wahrscheinlichste vorgezogen. Das untersuchte Material von *S. trifoliorum* erbringt in verschiedener Hinsicht komplettierende Unterstützung für diese Theorie, die darauf hinausläuft, dass die Haken in ihrer ursprünglichen Funktion Vermehrungsorgane für die sporenproduzierenden Elemente, die Aski, sind. Demgemäss wirken bei *S. trifoliorum* Schnallen in den sekundären ascogenen Hyphen indirekt (Ausgangspunkte für Verzweigungen), und direkt (Mitwirkung bei der transitorischen Askusbildung) als Vermehrungsorgane für Aski.

Aus den cytologischen und biologischen Beobachtungen ging weiter hervor, dass die Entwicklung der haploiden Gewebe des Fruchtkörpers und die Entwicklung der Dikaryophase zwei zeitlich in der Regel verschiedene Prozesse sind. Die erstgenannte Entwicklung kann im Dunkeln vor sich gehen und wird von gewissen Lichtmengen gehemmt, während letzterer Prozess für seine Entwicklung eine gewisse Lichtmenge benötigt (in etiolierten und in gewissen im Schatten entwickelten Apothecienstielen wurden nämlich keine ascogenen Hyphen beobachtet). Das Vorhandensein von ascogenen Hyphen in sehr kurzen sonnenbestrahlten Stielen deutet weiter darauf hin, dass diese beiden Entwicklungsprozesse bei bestimmten Lichtverhältnissen im grossen und ganzen gleichzeitig vor sich gehen können.

Regenerationsversuche mit herauspräparierten, ascogenen Hyphen auf synthetischem Nährboden verliefen negativ (vgl. die negativen Ergebnisse mit *Pyronema* (KERL 1937) und die positiven mit *Sordaria* (GREIS 1941).

Nach Karyogamie im jungen Askus (Fig. 32—37) wird die meiotische Prophase eingeleitet, in welcher man mehrere für eine normale Reduktionsteilung charakteristische Stadien wiederfindet (Fig. 38—42). Während Pachytän tritt ein markantes diffuses Stadium auf mit verminderter Basikromaticität des Karyotins, dessen Bedeutung später erörtert wird (Seite 139). Bei sämtlichen drei Kernteilungen im Askus wurden etwa 6 Chromosomen beobachtet (Fig. 43—54). Die reifen Sporen waren vierkernig (Fig. 59). In Ausnahmefällen wurden achtkernige Sporen beobachtet. Das chondriosomale Material ist abgebildet in Fig. 62—67. Extranucleäre Körper von ziemlich regelmässiger Form und Auftreten mit derselben Färbbarkeit wie Nucleolus kommen sowohl in ascogenen Hyphen vor als auch in Aski und Sporen (Fig. 68—79). Ihre Funktion ist unsicher; gewisse Beobachtungen bei den simultanen Kernteilungen in den primären ascogenen Hyphen deuten darauf hin, dass sie möglicherweise Dienst tun als eine Art für die beiden Kerne orientierendes und die Richtung bestimmendes Organ im

Zusammenhang mit der Einnahme der seitlichgestellten Ausgangslage für die simultanen Teilungen (Fig. 17, 18). Cytologische Untersuchungen von *S. sclerotiorum* Schröt. (Fig. 80—95) und *S. borealis* Bubák & Vleugel (Fig. 96—114) zeigten in allen wesentlichen Beziehungen dieselben Bilder wie bei *S. Trifoliorum* und bestätigen demgemäss die Richtigkeit der vorhergehenden Resultate. Die haploide Chromosomenzahl bei diesen beiden Arten konnte nicht exakt bestimmt werden, scheint aber wie bei der vorhergehenden Art um sechs herum zu liegen. Die reifen Sporen bei *S. sclerotiorum* sind zweikernig; bei *S. borealis* in der Regel achtkernig, aber nicht selten sechzehnkernig.

Mikrokonidien. Verschiedene Versuche zur Klarlegung der Bedingungen für die intrabiotypische Mikrokonidienbildung misslangen. Gewisse Beobachtungen gingen jedoch in derselben Richtung wie COLEMANS Annahme (1907) und führten zu einem Anschluss an diese Annahme, dass ein oder mehrere Stoffwechselprodukte mitwirken.

Von Interesse war dagegen die Beobachtung, dass eine markante Vermehrung in der Mikrokonidienbildung eintrat, wenn zwei oder mehrere genotypisch ungleiche Myzel oder Sporen zusammen kultiviert wurden (Fig. 116, 132, 134, 135). Diese Reaktion liegt zugrunde der im folgenden berichteten Analysen morphologisch gleicher Biotypen.

Betreffend die Funktion der Mikrokonidien wird die Spermatisierungstheorie erörtert (DRAYTON 1932, 1934, 1937, WHETZEL 1937). Auf Grund cytologischer und experimenteller Untersuchungen bin ich zu der Auffassung gekommen, dass die Mikrokonidien bei *S. trifoliorum* nicht als Spermatien dienen. Ihre Funktionslosigkeit wird in Zusammenhang gebracht mit dem Umstand, dass *S. trifoliorum* selbstfertil ist und seine Dikaryophase direkt aus vegetativen homokaryotischen Hyphen entwickeln kann in Gegensatz zu *S. gladioli* Drayt., das selbststeril ist und für seine Dikaryophase zwei genotypisch verschiedene Zellkerne erfordert, von denen einer, wie man vermuten kann, durch Mikrokonidien von einem fremden Biotyp zugeführt wird.

Vegetative Entwicklung. Die Keimung der Askussporen bei verschiedenen Temperaturen geht aus dem Diagramm Fig. 120 hervor. Was das vegetative Wachstum des Myzels betrifft, wird der bemerkenswerte Zustand erörtert, dass die Temperatur für das optimale Wachstum in Kultur (15—20° laut PAPE, 1937) wesentlich abweicht von der Temperatur, bei welcher normalerweise die kräftigste Ausbreitung des Pilzes auf der Wirtspflanze in der Natur vor sich geht (in Schonen in der Zeit November —December und März bei zirka 10° niedrigerer Temperatur als der kulturoptimalen). Von mir ausgeführte Anbauversuche auf Klee und Nähragar bei verschiedenen Temperaturen und gleichmässig hoher Luftfeuchtigkeit (Fig. 121—124) zeigten doch, dass das wirkliche Optimum für die Ent-

wicklung auf der Wirtspflanze nicht bei so niedriger Temperatur liegt wie in der Natur, sondern ungefähr an derselben Stelle wie das Kulturoptimum (Fig. 123, 124). Aus Kontrollversuchen ging hervor, dass weder die Vitalitätsveränderung im Zusammenhang mit dem Abschneiden der Kleeblätter noch die Vorbehandlung der Kleepflanzen bei verschiedenen Temperaturen einen wesentlichen Einfluss hatten auf diese Versuchsresultate. *Sclerotinia trifoliorum* kann also nicht ohne weiteres in die *Gibberella-Thialavia*gruppe (FISCHER-GÄUMANN 1929) einrangiert werden, welche sich dadurch auszeichnet, dass die Temperaturoptima des Parasiten in Kultur und auf der Wirtspflanze bedeutend verschieden sind. Eine gewisse thermisch bedingte Depression in der Vitalität (Resistenz) der Wirtspflanze konnte jedoch auch festgestellt werden in dem *Sclerotinia*-Kleekomplex, indem die Myzelentwicklung bei niedrigeren Temperaturen verhältnismässig schneller vor sich ging auf Klee als in Kultur (Fig. 123, 124). Dass die grösste Verbreitung des Pilzes in der Natur bei einer um so viel niedrigeren Temperatur als der optimalen sich vollzieht, dürfte auf verschiedenen zusammenwirkenden Umständen beruhen. Das reichlichere Vorkommen von Infektionsmaterial und insbesondere die höhere relative Luftfeuchtigkeit bei diesen niedrigen Temperaturen scheinen die wichtigsten dieser Faktoren zu sein. Kennzeichnend für die schweren Winterangriffe ist nämlich, dass der Pilz durch kräftiges, hauptsächlich extramatricales Wachsen und Kontaktinfektionen sich von Pflanze zu Pflanze ausbreitet. Die äussere Voraussetzung für die Entwicklung der charakteristischen, der Luft frei ausgesetzten Myzelmatten in den Kleefeldern während der Wintermonate scheint nicht nur genügend hohe Luftfeuchtigkeit unten im Kleebestand selbst zu sein, sondern auch oberhalb desselben. Von mir ausgeführte Gewächshausversuche mit Myzelkulturen auf Kleepflanzen bei gleicher Temperatur, aber variierender Luftfeuchtigkeit zeigten, dass angefangene Myzelentwicklung auf Kleeblättern bei 89—95 % und 100 % Luftfeuchtigkeit sich kräftig fortsetzte, bei 70—90 % so gut wie vollständig und bei 60—80 % vollständig abgebrochen wurde (Tab. 4). Das Diagramm Fig. 125 zeigt, dass Luftfeuchtigkeiten, die an die 90 % herankommen, in der Gegend von Lund nur während der Wintermonate vorkommen. Diese Werte sind jedoch Durchschnittszahlen und die Luftfeuchtigkeit ist periodenweise z. B. bei Nebel höher als 90 %.

Die Variation.

Modifikative Variation. Methodologische Anbauversuche wurden auf gleichem Substrat (Nähragar) mit gewissen Biotypen ausgeführt. Betreffend den Einfluss der Substratmenge werden frühere Resultate von NICOLAISEN et al. (1940) bestätigt. Auch die Menge des Impfungsmaterials (Fig. 126) und dessen allgemeine Beschaffenheit hatte Einfluss auf das Aussehen der Kultur (Fig. 127—129). Wahrscheinlich modifikative Abweichungen

mit vermehrter Mikrokonidien- und gehemmter Sclerotienbildung traten in einem Versuch auf mit Impfungsmaterial verschiedenen Alters (Fig. 130, 131). Diese Myzelabweichungen zeigten eine bemerkenswerte vegetative Konstanz, sind aber wahrscheinlich rein modifikativ. Diese Beobachtungen bestätigen frühere Beobachtungen von NICOLAISEN et al. betreffend Degenerationserscheinungen in älterem Myzel oder Sclerotienmehl. In Hinsicht der Askosporengrösse zeigten sich signifikative Unterschiede zwischen Sporen von Apothecien aus Sclerotien, gebildet auf Klee und künstlichem Substrat (Brot, Nähragar). Die von Klee herstammenden Sporen waren grösser als die übrigen (Tab. 5).

Durch genotypische Unterschiede bedingte Variation. Durch vergleichende Anbauversuche auf Agar mit mehreren Stämmen konnte der Verfasser PAPES Versuchsresultate (PAPE 1937) bestätigen, laut welchen eine auf morphologischen Kulturcharakteren gegründete Rassenanalyse schwer durchführbar war. Auch die von NICOLAISEN et al. (1940) erreichten Resultate, dass gewisse Myzeltypen sich konstant halten nach sexueller Reproduktion in mehreren Apotheciengenerationen, konnte ich bestätigen bei vergleichendem Anbau von Einsporenkulturen von vier verschiedenen reinen Linien in 2. und 3. Apotheciengenerationen. Eine nur auf dem Wachstumbild gegründete Methode, die Biotypenvariationen bei *S. trifoliorum* im einzelnen zu analysieren, ist doch meiner Meinung nach teils begrenzt und teils unsicher. In verschiedenen Fällen waren nämlich bei den vorliegenden Untersuchungen physiologisch ungleiche Biotypen morphologisch gleichartig. Messungen von Askosporen zeigten ebenfalls, dass statistisch sichere Unterschiede bei einem Teil der Biotypen gefunden wurden, aber nicht bei dem anderen (Tab. 6). Wesentliche Unterschiede in der Sclerotienbildung auf der Wirtspflanze (Tab. 7) wurden bei zwei in Agarkultur morphologisch gleichen Biotypen (Sval 16-1 von Rotklee und Sval 17-1 von Schwedenklee) beobachtet. Diese Methode, verschiedene *Sclerotinia*biotypen zu unterscheiden, wird infolge ihrer zeitraubenden Beschaffenheit selbstverständlich keine praktische Bedeutung bekommen. Es ist natürlich offenkundig, dass man bei der Beurteilung des allgemeinen pathogenen Wertes eines *Sclerotinia*-biotyps Rücksicht nehmen muss nicht nur auf die Aggressivität, sondern auch auf die Unterschiede in der Fähigkeit, auf der Wirtspflanze Sclerotien zu bilden.

Für eine detallierte Analyse wurde die Tatsache zugrunde gelegt, dass bei Anbau von verschiedenen Biotypen auf derselben Agarplatte markante weisse Linien von Mikrokonidien in der Zusammenwachszone (Fig. 132, 134, 135) entstanden. Diese Demarkationslinien zeigten sich nicht bei ähnlichen Kulturen mit Myzel oder Sporen derselben oder verschiedener Apothecien innerhalb desselben Biotyps. Durch diese Beobachtungen und einige allgemeine Annahmen betreffend die Variationsmöglichkeiten der Biotypen

in der Natur bin ich zu der Auffassung gekommen, dass die Demarkationslinienbildung in Kultur für eine detaillierte Biotypanalyse zugrunde gelegt werden kann. Es scheint mir auch wohl motiviert zu sein, bei einer solchen Analyse die Arbeitshypothese aufzustellen, dass die Bildung von Demarkationslinien zwischen zwei unbekannten Myzeln als ein sicheres Zeichen dafür anzusehen ist, sie seien genotypisch verschieden, und weiter, dass das Nichtvorhandensein von Linien in jedem Fall als ein Indikator dafür gewertet wird, die Myzel seien mit grosser Wahrscheinlichkeit genotypisch gleich. Die Resultate der Analysen von Feldmaterial gehen aus Tab. 8 hervor. Ein Teil der Apothecien war heterokaryotisch und die Sporennachkommenschaft enthielt mehrere verschiedene Biotypen, Tab. 9. Diese Apothecien wurden aus isolierten Feldsclerotien aufgezogen, weshalb Verunreinigungen in Form von biotypfremden Askussporen auf der Oberfläche der Fruchtscheiben ausgeschlossen waren.

Kreuzungsversuche mit einigen Biotypen wurden auf Klee und Agar ausgeführt mit intimen Mischungen des Impfmaterials auf den Kleeblättern oder in der Mitte der Agarplatte (Fig. 136). Auf diese Art bekam man mehrere heterokaryotische Sclerotien und Apothecien, deren Sporen analysiert wurden. Die Resultate der Analysen eines der Versuche gehen aus Tab. 10 hervor. Die Sporen aus den Apothecien Nr. 4—7 in dieser Tabelle wurden direkt aus den Aski mit Mikromanipulator entnommen. Die geringe Keimfähigkeit bei diesen Sporen dürfte ihre Erklärung finden können in mechanischen Schäden bei der Entnahme. — Vegetative Vermehrungen mittels Hyphenspitzen einer Subkultur aus dem Inneren eines heterokaryotischen Sclerotium, das von zwei morphologisch verschiedenen Biotypen gebildet wurde, zeigten grosse morphologische Variation (Fig. 137—141). Die Reaktionstype in Bezug auf die Bildung von Demarkationslinien war entweder gleich der einen (Fig. 139) oder der anderen Elternbiotype (Fig. 140) oder variierend (Fig. 141).

Plasmatische Einflüsse auf den Morphotyp scheinen eine gewisse, aber nur vorübergehende Rolle zu spielen, da die auch in morphologischer Hinsicht reinen Elternbiotypen nach einer gewissen Zahl vegetativer Vermehrungen wiedergebildet wurden. Gestützt auf die Resultate von HARDERS bekannten Merogonieversuchen (HARDER 1927) wird angenommen, dass das Cytoplasma der in diesen Versuch einbezogenen *Sclerotinia*biotypen prinzipiell gleichartig ist und dass die Zellenkerne dominierenden Einfluss ausüben sowohl auf die morphologischen als auch auf die physiologischen Kulturcharaktere. In diesem Zusammenhang wird auch DODGE's Kreuzungsversuch mit verschiedenen *Neurospora*arten (DODGE 1928) erörtert. Keine Apothecien wurden aus diesen heterokaryotischen Sclerotien erzielt.

Cytologische Beobachtungen in gewissen Apothecien. In Apothecien, die abgeschnitten und zum Sporenstäuben gelegt wurden, beobachtete man nach

etwa 24 Stunden später stattfindender Fixierung Abweichungen von der normalen gleichmässigen Sporendifferenzierung, indem gewisse Aski vier dunkle und vier helle Sporen zeigten (Fig. 145—148). Dies geschah sowohl bei homo- als auch heterokaryotischen Aski und konnte deshalb nicht Ausdruck für eine Faktorenspaltung sein. Diese Erscheinung ist, nach einigen experimentellen Versuchen zu urteilen, das sichtbare Zeichen für Nachwirkung einer Störung in den Kernteilungen im Askus bei Gelegenheit des Abschneidens der Apothecien. Es war bemerkenswert, dass nur solche Kombinationen zwischen hellen und dunklen Sporen vorkamen, welche auch bei wirklicher Faktorenspaltung in der ersten oder zweiten Teilung eingetreten wären (Fig. 142). Gewisse Abweichungen von den durch DODGE (1927) und KNIEP (1929) aufgestellten theoretischen Figuren für die Faktorenspaltungen in Aski konnten in Hinsicht auf das *Sclerotinia*material erklärt werden durch eine gewisse Interferenz bei den Kernteilungen im Askus in Form von Platzwechsel von neugebildeten Schwester- und Nichtschwesterkernen, wofür cytologische Beobachtungen zugrunde liegen (Fig. 60, 61). Die theoretisch möglichen Sporenkombinationen bei einer angenommenen Faktorenspaltung in der 1. 2. oder 3. Teilung sind zusammengestellt in Tab. 11.

Erörterung.

Cytologische Beobachtungen. Wenn man von der ungewöhnlich gut entwickelten dikaryotischen Phase absieht, die das untersuchte *Sclerotinia*-material charakterisiert, zeigt es im grossen und ganzen dasselbe cytologische Bild wie die Mehrzahl der in dieser Beziehung bekannten höheren Askomyceten. Demzufolge gibt es nur eine Kernverschmelzung, nämlich in dem jungen Askus und eine darauf folgende normale Askomycetmeiose. Keine weitere Reduktion der Chromosomenzahl (Brachymeiose) kommt in der dritten Teilung im Askus vor. Eine Erscheinung, die jedoch verdient näher erörtert zu werden, ist das Vorkommen des ausgeprägten diffusen Stadiums während der ersten meiotischen Prophase. Dieses diffuse Stadium, das seinen Grund hat in der verminderten Empfänglichkeit des Karyotins für basische Farbstoffe, scheint, nach einem Teil der älteren Untersuchungen zu urteilen, eine ziemlich allgemein vorkommende Phase der Askomycetmeiose zu sein. GUILLERMOND, der eine grosse Anzahl Arten cytologisch studiert hat, hebt besonders hervor (1905), dass nur zwei Arten (*Humaria rutilans* und *Peziza catinus*) ein abweichendes Verhalten zeigen mit beibehaltener basichromatischer Färbbarkeit während der ganzen Prophase. Bei diesen beiden, insbesondere der erstgenannten, sind die Kerne mehr karyotinreich als in den übrigen Fällen. Auch bei *Ascobolus stercorarius*, der sich gleichfalls auszeichnet durch grosse Karyotinmenge im primären Askuskern, ist das diffuse Stadium nicht ausgeprägt (BJÖRLING 1941).

Möglicherweise verhalten sich auch die *Erysiphaceen* auf die gleiche Weise. In späteren cytologischen Untersuchungen scheint diese Einzelheit der Aufmerksamkeit entgangen zu sein und die Beobachtungen haben aus anderen Gründen (Brachymeiosenfrage) sich hauptsächlich konzentriert um spätere und deutlicher hervortretende Stadien in der Meiose, insbesondere die Chromosomenzahl in den verschiedenen Teilungen. GUILLERMOND (1903, 1904, 1905) suchte die verminderte basichromatische Färbbarkeit in früheren Prophasestadien dadurch zu erklären, dass er sie in Zusammenhang brachte mit dem bei gewissen Arten, insbesondere *Galactinia succosa,* beobachteten Auftreten von basophilen Körpern ausserhalb der Kernmembran. Dies sollte also zur Voraussetzung haben eine mehr oder weniger vollständige Absonderung im Cytoplasma von der basichromatischen Substanz des Kerns mit Ausnahme des Nucleolus, der die ganze Zeit seine Färbbarkeit beibehält. MAIRE, der auch diese Sachlage studiert hat, insbesondere bei *Galactinia succosa* (MAIRE 1903, 1905), fand ausser kleinen basophilen Körnern unmittelbar ausserhalb des Zygotenkerns im Askus andere chromatische Körper von verschiedenen Typen, von welchen man wenigstens teilweise annahm, dass sie direkte Sekretionsprodukte vom Kern seien, was aber nicht in Zusammenhang gebracht wurde mit dem Entstehen des diffusen Stadiums. Bei vielen Arten ist jedoch das Vorkommen von basophilen extranucleären Körpern im Askus sehr unbedeutend oder gar nicht vorhanden. Die extranucleären Körper bei den in dieser Arbeit untersuchten *Sclerotinia*arten sind bestimmt von einer anderen Art als die obengenannten basophilen Körner, vermögen schwer in Zusammenhang gebracht zu werden mit einer Absonderung basichromatischen Materials während der ersten meiotischen Prophase und können nur schwer durch eine solche erklärt werden. Einer solchen Annahme widerspricht u. a. ihr regelmässiges Auftreten im Zwei- und Vierkernestadium im Askus, sowie ausserhalb der vegetativen Sporenkerne und in den ascogenen Hyphen.

Um die Entstehung des diffusen Stadiums zu erklären ist es meiner Meinung nach nicht notwendig, eine Ausstossung von fester Substanz vom Zygotenkern während der Prophase vorauszusetzen. Chemische Veränderungen innerhalb des Kernes selbst können an und für sich mit beibehaltener Karyotinmenge eine hinreichende Ursache sein für eine vorübergehende Verminderung der Färbbarkeit. Diese vorausgesetzten chemischen Veränderungen sind vielleicht dadurch bedingt, dass der Zygotenkern im Askus ausser seiner generativen auch eine bedeutende vegetative Aufgabe zu lösen hat. Ein Vergleich mit dem Zellenmilieu des Phanerogammeiosis (PMC, EMC) zeigt, dass der Zygotenkern im Askus während der Prophase im Zusammenhang mit dem enormen und in der Regel schnellen Wachstum des Askus eine anspruchsvollere metabolische Kontrolltätigkeit zu erfüllen hat als entsprechende Kerne bei den Phanerogamen, (respektive Meiocyt-

kernen). In dieser Beziehung weist die Askomycetmeiose eher gewisse Gleichheiten auf mit der animalen Meiocytentwicklung, insbesondere der Ovogenese, wo ein sehr charakteristisches diffuses Stadium vorkommt innerhalb des Pachytän und Diplotän im Zusammenhang mit dem bedeutenden Wachstum und der Differenzierung des Eies (WILSON 1928). — Dass das entsprechende Stadium bei den Askomyceten in verschieden hohem Grade ausgeprägt ist bei den verschiedenen Arten, dürfte durch einige Ungleichheiten in der Kernstruktur und der Askusentwicklung erklärt werden können. Bei den untersuchten *Sclerotinia*arten befindet sich der verhältnismässig karyotinarme Zygotenkern im Askus so lange in Prophase, bis der Askus seine definitive Grösse erreicht hat; er ist also während dieser ganzen Zeit metabolisch wirksam. Bei dem verhältnismässig karyotinreicheren *Ascobolus stercorarius* gehen alle drei Kernteilungen vor sich bei einer Askuslänge, die knapp der Hälfte der definitiven entspricht, was eine beitragende Ursache dafür sein kann, dass das diffuse Stadium bei dieser Art nicht so ausgeprägt ist. Der Zygotenkern bei *Humaria rutilans* anderseits wird nicht geteilt, bevor der Askus seine nahezu endgültige Grösse erreicht hat, aber diese Art nimmt bis auf weiteres, wie früher erwähnt, eine Sonderstellung ein durch ihre für Askomycetenverhältnisse ungewöhnlich grossen und karyotinreichen Kerne. Die Askusentwicklung der *Erysiphaceen* schliesslich weicht von der Entwicklung der in der Regel besser bekannten fleischigen Discomyceten u. a. dadurch ab, dass sie bedeutend langsamer vor sich geht. Gemäss den Untersuchungen, die ich auf *Erysiphe graminis* ausgeführt habe, befindet sich der Zygotenkern wenigstens zwei Monate im Pachytänstadium; während dieser Zeit kommt kein merkbares vegetatives Wachstum im Askus vor, welcher schon früher seine so gut wie endgültige Grösse erreicht hat.

Sterilität. Es konnte schon vorher (Seite 133) mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden, dass der in Frage kommende Typ der Sterilität innerhalb genetisch einheitlichen Sporenmaterials durch äussere Umstände hervorgerufen wurde, wahrscheinlich bestehend in einer Störung der Kernteilungen im Askus bei der Dekapitierung oder beim Erschüttern der Apothecien, wenn diese von den Keimungskulturen abgehoben wurden, um zum Sporenstäuben gelegt zu werden. Cytologische Beobachtungen in solchen Apothecien erwiesen eine Ungleichheit in der Sporendifferenzierung, welche als Nachwirkung einer solchen Störung gedeutet werden konnte. Worin der wirkliche Unterschied zwischen den fertilen und den, wenigstens zu Anfang ebenso vitalen, sterilen Nachkommen eines solchen Apotheciums besteht, konnte dagegen nicht zufriedenstellend erklärt werden. Die Resultate von vergleichenden Versuchen zeigten, dass die Sterilität und die damit korrelativ zunehmende Degeneration in Kultur dauernd war, und dass demzufolge die Störung im Mutterapothecium auf entscheidende Weise in

die Gestaltung der Sporen eingegriffen hat, die später sterile Myzel bildeten. Es ist denkbar, dass dies geschehen kann entweder durch eine Veränderung der Struktur der sterilen Sporenkerne (beispielsweise durch Chromasomenaberrationen) oder durch eine ungleichmässige Ausrüstung von gewissen cytoplasmatischen Organen (Chondriosomen, extranucleären Körpern) in den in Frage kommenden Sporen. Obwohl exakte Beweise dafür, welche von diesen Möglichkeiten wirklich vorhanden ist, schwerlich aus dem vorliegenden Material erbracht werden können, sprechen doch verschiedene Tatsachen dafür, dass die Ursache der Sterilität nicht in Veränderungen der Kernstruktur zu suchen ist. Dies würde mit Rücksicht auf die geringe Art der Störung eine grosse Labilität bei den Kernen voraussetzen, welche in dem verhältnismässig umfangreichen Material sich gezeigt haben müsste durch eine bedeutende Frequenz sicherer Mutationen verschiedener Typen innerhalb der Sporenabkommen. Das ist jedoch nicht der Fall. Die gleichartigen Degenerationssymptome innerhalb wesentlich ungleicher Biotypen würden weiterhin unter dieser Voraussetzung sich auf gleichartige und bestimmte Störungen in der Kernstruktur gründen, was weniger wahrscheinlich zu sein scheint. Auch der Zustand, dass sterile und fertile Nachkommen aus demselben Biotyp keine Demarkationslinien miteinander bildeten, sowie das Vorkommen von normal fertilen Kreuzungsapothecien aus sterilen und fertilen Einzelspurenkulturen von verschiedenen Biotypen sprechen gegen die Annahme von Veränderungen in der Kernstruktur.

Die andere Möglichkeit, eine ungleichmässige Verteilung von Chondriosomen oder extranucleären Körpern bei den früher oder später reifenden Sporen, ist denkbar, obwohl cytologische Beweise hierfür nicht vorliegen. Die äussere Störung würde in diesem Falle eine Verrückung des normalen, harmonischen Verhältnisses zwischen den Kernteilungen und der Verteilung dieser cytoplasmatischen Körper verursachen. Sporen mit einer mangelhaften oder abnormen Ausrüstung von letztgenannten Körpern dürften laut dieser Annahme Veranlassung geben zu sterilen Myzeln. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass solche Annahmen anknüpfen an die — sie in gewissen Beziehungen komplettierend — neulich von WINGE aufgestellte Hypothese von einer ungleichmässigen Chondriosomenverteilung als möglicher Ursache für Letalität bei direkter Diploidisierung in gewissen Hefepilzmyzeln (WINGE and LAUSTSEN 1940).

Aus dieser Erörterung dürfte hervorgehen, dass ich die sterilen Myzel nicht als Mutation im eigentlichen Sinn betrachte. Anderseits können sie nicht ohne weiteres als gewöhnliche Modifikationen bezeichnet werden, sondern man muss die dementsprechend in die unsichere und schwer definierbare Gruppe »Dauermodifikationen» einreihen.

Morphologische und physiologische Myzelvarianten mit mehr oder weniger grosser vegetativer Konstanz sind vielfach unter verschiedenen Benennungen

(Sektor, Saltation, Mutation) beschrieben worden in der mykologischen Literatur (HÆNICKE 1916, CHODAT 1926, CHRISTENSEN and STAKMAN 1926, BARNES 1935 usw.). Ein Teil dieser Varianten war spontan, ein anderer induziert. Obwohl es nicht durch Versuche erwiesen worden ist, dass diese Varianten erblich sind, dürfte es laut KNIEP (1929) sich in einem Teil der Fälle um wirkliche Mutationen handeln. Einige andere Fälle, besonders solche, welche Fungi imperfecti betreffen, kann man wahrscheinlich dadurch erklären, dass die permanenten Veränderungen durch Verschiebungen der Proportionen zwischen genotypisch verschiedenen Zellkernen in heterokaryotischen Myzeln (»dual phenomenon» HANSEN 1938) entstanden sind. Die übrigen können also klassifiziert werden als zufällige Modifikationen oder »Dauermodifikationen». Es ist möglich, dass die Beobachtungen über das Entstehen von sterilen Myzeln bei *S. trifoliorum* beitragen können zu einem erweiterten Verständnis des Mechanismus bei der Bildung eines Teiles solcher scheinbar spontanen Varianten bei anderen Pilzen.

Schliesslich muss hervorgehoben werden, dass die in Frage kommende Apothecienstörung, deren Nachwirkung in ungleicher Sporendifferenzierung und Sterilität bei gewissen Sporenabkommen bestand, von so geringfügiger Art war, dass die Annahme berechtigt sein kann, auch in der Natur kämen ähnliche Störungen mit ähnlichen Nachwirkungen vor. Hierdurch können bei Untersuchungen von Feldmaterial, das unter nicht näher bekannten Umständen isoliert worden ist, leicht Fehlschlüsse gezogen werden, indem auch genetisch einheitliches Material ein falsches Bild von Heterokaryotie geben kann.

Resultate der Kreuzungsversuche. Es ist bemerkenswert, dass in keinem dieser Versuche einer der reinen Elternbiotypen in den Sporennachkommen auftrat. Bei einer zufallsmässigen Verteilung den Zellkerne der Ausgangsbiotypen in der dikaryotischen Phase und unter Voraussetzung von gleich grosser Wachstumsschnelligkeit bei den autogamen und allogamen ascogenen Hyphen sollte man in den Sporennachkommen von heterokaryotischen Apothecien ein Auftreten jeder der beiden Elternbiotypen erwarten in einer Häufigkeit von mindestens 25 %. Die 25 % übersteigenden Fälle müssen herrühren von Abspaltungen der reinen Ausgangsbiotypen von den heterozygotischen Verschmelzungskernen im Askus. Die Häufigkeit solcher Fälle nimmt jedoch wie bekannt sehr schnell ab mit wachsender Anzahl von Gendifferenzen und würde wahrscheinlich bei der Mehrzahl der hier in Frage kommenden Versuche nicht merkbar sein. Die Individuenanzahl der Nachkommen der Kreuzungsapothecien war zwar nicht so umfassend, aber doch gross genug um eine deutliche Abweichung von dem oben umrissenen Schema mit dieser erheblichen Reproduktion von Elternbiotypen. Sicherlich lag in diesen Kreuzungsprodukten ein Heterosiseffekt der einen oder anderen Art vor, entweder in Form von Certation zwischen allogamen und autoga-

men Hyphen zum Vorteil der ersteren oder in der Form, dass autogame ascogene Hyphen überhaupt nicht in den heterokaryotischen Apothecien gebildet wurden. Es ist möglich, dass umfassende cytogenetische Untersuchungen von Kreuzungen zwischen genau bekannten Biotypen darüber Bescheid geben könnten, in welcher dieser Formen der Effekt sich äussert. Die Bedeutung dieses Heterosiseffekts liegt insbesondere darin, dass er in bedeutendem Mass dazu beiträgt, die Variation innerhalb der Art zu vermehren.

Die Variation im allgemeinen. Es ist früher besonders durch PAPES und NICOLAISENS et al. umfassende Untersuchungen klargelegt worden, dass *Sclerotinia trifoliorum* in Hinsicht auf die Kultur eine sehr grosse modifikative Variabilität zeigt, wenn die Kultur auf verschiedenen Substraten, bei verschiedenen Temperaturen, pH oder Kohlensäurekonzentrationen durchgeführt wird. An Hand der vorliegenden Versuche ist gezeigt worden, dass auch auf demselben Substrat grosse modifikative Variationen auftreten können, sogar bei verhältnismässig unbedeutenden Veränderungen in der Anbautechnik. Eine genaue Beachtung der Substratmenge und der Beschaffenheit des Impfungsmaterials reduziert jedoch diese Variation innerhalb der Biotype zu einer Geringfügigkeit. Von gewissen Interesse ist ferner die Konstatierung, dass das Substrat, auf welchem die Sclerotien gebildet werden, modifikativ einwirkt auf einen so stabilen Gegebenheit wie die Askussporengrösse.

Betreffend die durch genotypische Unterschiede bedingte Variation kann auf Grund der vorliegenden Untersuchungen konstatiert werden, dass oft nur unbedeutende und schwer definierbare Unterschiede im Aussehen der Kulturen zwischen verschiedenen Biotypen vorkommen. In mehreren Fällen, auch solchen, in denen das Material von verschiedenen Wirtspflanzen herrührte, konnten überhaupt keine morphologischen Unterschiede zwischen Biotypen notiert werden, die laut anderen Versuchen physiologisch ungleich waren. Die Unterschiede in der Askosporengrösse zwischen den Biotypen waren in gewissen Fällen deutlich und signifikativ, in anderen Fällen unbedeutend und statistisch unsicher. Ein beschreitbarer Weg zur Gewinnung eines ins einzelne gehenden Einblickes in die genotypisch bedingte Variation erbot sich durch die physiologischen Verschiedenheiten der Biotypen, die hervortraten durch eine markante Vermehrung in der Mikrokonidienbildung beim gemeinsamen Anbau von genotypisch verschiedenem Myzel. Hierdurch wurde ohne Schwierigkeit eine Differenzierung erzielt auch zwischen morphologisch nicht zu unterscheidenden Biotypen. Die Resultate solcher Analysen zeigten, dass die Variation sehr gross ist; verschiedene Orten innerhalb derselben oder verschiedener Länder waren durch verschiedene Biotypen vertreten. Auch innerhalb derselben Örtlichkeit z. B. innerhalb eines Kleefeldes war die Variation bedeutend, indem jedes Individum oft einen beson-

deren Biotyp repräsentierte. In gewissen Fällen wurden von demselben Feld zwei oder mehrere Individuen isoliert, die demselben Reaktionstyp angehörten und entsprechend der aufgestellten Arbeitshypothese daher auch wahrscheinlich demselben Biotyp angehörten. Es muss doch in diesem Zusammenhang hervorgehoben werden, dass die detaillierten Lokalanalysen ausgeführt wurden auf Material aus Schonen, wo man aus verschiedenen Gründen voraussetzen kann, dass die Heterogenität grösser ist als in gewissen sonstigen Gegenden von Schweden. Besonders im südlichen und westlichen Schonen mit seinem intensiven und in geographischer Hinsicht so gut wie kontinuierlichen Ackerbau müssen die Möglichkeiten für eine Vermischung verschiedener Biotypen durch Askosporenverbreitung durch den Wind von einem Feld zum anderen und von einem Ort zum anderen grösser sein als in den meisten anderen Gegenden des Landes. Dazu kommt die Verbreitung durch die Aussaat. Insbesondere muss dies für die verschiedenen Pflanzenzuchtanstalten gelten, wo oft Saatgut, das von weit voneinander entfernten Orten stammt, gleichzeitig auf begrenzten Arealen angebaut wird. Dass Sclerotien von *S. trifoliorum* oft mit dem Samen eingeschleppt werden, ist nämlich früher bei verschiedenen Gelegenheiten nachgewiesen worden (Beretning från Statsanstalten Dansk Frökontrol 1893—1903, Troussowa 1927, Pape 1937 usw.).

Auf diese Weise eingeschleppte fremde Biotypen mit abweichender Genaufstellung können wahrscheinlich, auch wenn sie anfangs nur durch einzelne Individuen vertreten sind, durch Kreuzungen mit vorher vorhandenen Biotypen schnell die Variation an einem bestimmten Ort vermehren. Diese Annahme wird auch durch die ausgeführten Kreuzungsversuche bestätigt, in denen die Variation bei den Sporennachkommen von Kombinationsprodukten zwischen Biotypen von Svalöv und Weibullsholm (Tab. 10) bemerkenswert grösser war als die Variation in den Sporennachkommen von heterokaryotischen Feld- oder Kreuzungsapothecien (Tab. 9) mit lokalen Svalövsbiotypen als Ausgangsmaterial.

Eins der untersuchten Felder in der Gegend von Dalby (Gruppe 5, Seite 109), ein normales Ackerbauareal ohne Beziehung zu irgendeiner Pflanzenzuchtanstalt, wo man also eventuell eine etwas einheitlichere Zusammensetzung der *Sclerotinia*population erwarten konnte, wies doch mindestens ebenso grossen Biotypenreichtum auf wie die Felder von Svalöv. Die Aussaat für das Dalbyfeld stammte aber laut Angabe aus nicht weniger als drei verschiedenen Orten, was zu einer Erklärung der grossen Variation beitragen kann. Ein anderes Feld in der Gegend von Hörby mit einheitlicher Aussaat (Gruppe 6, Seite 109) zeigte bedeutend geringere Variation (5 mit dem Reaktionstyp identischen Individuen von 7 untersuchten). Es ist deshalb sehr wohl möglich, dass eine Analyse von *Sclerotinia*populationen an anderen Orten in Schweden, insbesondere von solchen, die mehr oder weniger isoliert

liegen — mit eigener Samenproduktion —, eine noch grössere Einheitlichkeit als im letztgenannten Falle aufweisen würde.

Ein wichtiger Faktor, der dazu beiträgt, den *Sclerotinia*bestand an einem bestimmten Ort aufrechtzuerhalten, ist ferner die von NILSSON-LEISSNER (1934, 1935) nachgewiesene Eigentümlichkeit, dass der Pilz ausser Klee und einem Teil anderer angebauten Leguminosen verschiedene wilde Pflanzen, ungleichen Familien angehörend, von welchen mehrere als Unkraut in Kleewiesen auftreten, angreift und auf ihnen seinen Entwicklungszyklus durchläuft.

Schlussbemerkungen. Die Resultate der vorliegenden Untersuchungen tragen dazu bei, eine für die Resistenzzüchtung von Klee und anderen Hülsenfrüchten gegen Kleekrebs wichtige Frage zu beleuchten, nämlich die Variation innerhalb der pathogenen (physiologischen) Rassen des Krankheitserregers. Obwohl die vorgenommenen Analysen nicht direkt die Variabilität der pathogenen Eigenschaften berühren, so ist es vom genetischen Gesichtspunkt aus offenkundig, dass prinzipiell die gleichen Variationsverhältnisse gelten zwischen einzelnen Biotypen wie zwischen den grösseren oder kleineren Gruppen von *Sclerotinia*biotypen, welche, abhängend von der Qualität und Quantität der Testsortimente, klassifiziert werden können als einzelne pathogene Rassen. Da aus den verschiedenen obengenannten Versuchen mit absoluter Gewissheit hervorgeht, dass neue Biotypen durch Kreuzungen gebildet werden können, ist es ebenfalls klar, dass neue pathogene Rassen auf dieselbe Weise entstehen können. Durch diese Feststellung bin ich zu einer Auffassung gekommen, die prinzipiell verschieden ist von der kürzlich durch NICOLAISEN et al. vertretenen, welche sich auf eine geringere Anzahl negativer Kreuzungsresultate gründet. Nach dieser Auffassung braucht man nicht mit einer derartigen Neubildung von pathogenen Rassen bei *S. trifoliorum* zu rechnen (l. c. 1940 p. 621—622: »Diese Tatsache stellt einen wesentlichen Vorteil für die Resistenzzüchtung gegen den Kleekrebs dar, da mit der Bildung neuer Formen des Erregers durch Kombination nicht gerechnet zu werden braucht»).

Obwohl das Problem der Resistenzzüchtung ausserhalb des Rahmens der vorliegenden Untersuchung fällt, lässt es sich nicht vermeiden, dieser wichtigen Frage einige weitere Worte zu widmen. Die Tatsache, dass neue pathogene Rassen durch Kreuzungen von bereits vorher vorhandenen gebildet werden können, erschwert natürlich die schon vorher komplizierte und noch im Anfangsstadium befindliche Resistenzzüchtung von Klee und anderen Hülsenfrüchten gegen *S. trifoliorum*. Hiermit ist natürlich nicht gesagt, dass eine solche Resistenzzüchtung unmöglich oder in der Praxis undurchführbar wäre. Im Gegenteil, ich brauche in diesem Zusammenhang nur hinzuweisen auf die beachtenswerten Züchtungsresultate in Form von gegen Kleekrebs

hochresistenten Kleestämmen, die bereits bei verschiedenen schwedischen Zuchtanstalten erreicht worden sind (SYLVÉN 1936, NILSSON-LEISSNER and NILSSON 1940, GELIN och SCHWANBOM 1941). Das Ausgangsmaterial bei diesen Züchtungsarbeiten bestand und besteht auch weiterhin noch aus einigen dazu besonders passenden Lokalstämme (namentlich von Rotklee), Ergebnis der resistenzzüchtenden Einwirkung der natürlichen Auswahl.

Die Entstehung und Bedeutung der für die Züchtung wertvollen Lokalstämme wird in gewisser Hinsicht noch mehr beleuchtet durch die erweiterte Kenntnis der Biologie des Krankheitserregers, wozu die vorliegende Arbeit beitragen will. Die Lokalstämme haben offenbar durch Selektion allmählich eine durchschnittlich hohe Resistenz erreicht gegen sämtliche in den fraglichen Gegenden vorkommenden Rassen von *S. trifoliorum*. Im Interesse einer erweiterten Kenntnis der Möglichkeiten, die für zukünftige Resistenzzüchtung zur Verfügung stehen, erscheint es mir besonders wichtig, in erster Linie zu versuchen, die Natur dieser sowohl in der Praxis als auch bei Versuchen beobachteten Resistenz klarzulegen.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, dass die Art *Sclerotinia trifoliorum* aus einer Menge physiologisch ungleicher, aber oft morphologisch schwer zu unterscheidender oder identischer Biotypen besteht. Die Biotypen sind selbstfertil und in der Regel homokaryotisch. Ausser diesen reinen Linien, welche die Hauptmasse in den Populationen zu bilden scheinen, kommen heterokaryotische Sclerotien und Apothecien in variierender Häufigkeit vor. Der regelmässige Kern- und Zellenteilungsmechanismus in der Dikaryophase vor der sexuellen Reproduktion im Verein mit einem gewissen Heterosiseffekt in heterokaryotischen Apothecien sind Mittel, den Formenreichtum der Nachkommen aus Kreuzungsprodukten zu vermehren, wodurch die erhebliche Variation innerhalb der Art beibehalten wird.

LITTERATUR.

AMES, L. M. 1932. An hermaphroditic selfsterile but cross-fertile condition in *Pleurage anserina*. Bull. Torr. Bot. Club 59

—»— 1934. Hermaphrodism involving selfsterility and cross-fertility in the ascomycete *Pleurage anserina*. — Mycologia 26.

ARNAUD, G. et BARTHELET, J. 1936. Les microconidies dans le genre *Sclerotinia*. Bull. Soc. Myc. France 52.

BACHMANN, F. M. 1912. A new type of spermogonium and fertilization in *Collema*. — Ann. Botany 26.

BARNES, B. 1935. Induced variation. — Trans. Brit. Myc. Soc. 20.

BARY, A. DE. 1884. Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bakterien. — Leipzig.

—»— 1886. Über einige Sclerotinien und Sclerotinienkrankheiten. — Botan. Zeitung 44.

BAUR, E. 1898. Zur Frage nach der Sexualität der Collemaceen. Ber. Deutsch. Botan. Ges. 16.

—»— 1904. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Flechtenapothecien I. — Botan. Zeitung 62.

Beretning fra Statsanstalten Dansk Frøkontroll. Tidskr. f. Planteavl. 1893/94 1902/03.

BJÖRLING, K. 1939. Undersökningar rörande klöverrötan. I Infektionsförsök med *Sclerotinia trifoliorum*. — Stat. Växtskyddsanst. Medd. 27. Bd 4. 1939—40.

—»— 1941. Zur Kenntnis der Kernverhältnisse im Ascus von *Ascobolus stercorarius*. — Kungl. Fysiogr. Sällsk. i Lund Förh. 11.

BREFELD, O. 1891. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie 9—12. — Münster i. W.

BRODIE, H. J. 1934. The occurence and function of oidia in the Hymenomycetes. Amer. Jour. Bot. 23.

BULLER, A. H. R. 1930. The biological significance of conjugate nuclei in *Coprinus lagopus* and other Hymenomycetes. — Nature 126.

—»— 1931. Researches on Fungi IV. — London.

—»— 1941. The diploid cell and the diploidisation process in Plants and Animals with special reference to the higher Fungi. — The botanical review. 7.

CARRUTHERS, D. 1911. Contributions to the cytology of *Helvella crispa*. — Ann. Botany 25.

CAYLEY, D. M. 1923. The phenomenon of mutual aversion between monospore mycelia of the same fungus (*Diaporthe perniciosa* March). — Jour. of Genetics 13.

CHESTER, F. D. 1890. Rot of scarlet clover caused by *Sclerotinia trifoliorum* Erik. — Delaware Agr. Exp. Sta. 3.

CHODAT, F. 1926. Recherches expérimentales sur la Mutation chez les Champignons — Bull. Soc. Bot. Genève. Série 2. 18.

CHRISTENSEN, J. J. and STAKMAN, E. C. 1926. Physiologic specialization and mutation in *Ustilago Zeae*. — Phytopathology 16.

Claussen, P. 1907. Zur Kenntnis der Kernverhältnisse von *Pyronema confluens*. — Ber. Deutsch. Botan. Ges. 25.

» 1912. Zur Entwicklungsgeschichte der Ascomyceten, *Pyronema confluens*. — Zeitschr. f. Botanik 4.

Coleman, L. C. 1907. Über *Sclerotinia Trifoliorum* Erikss., einen Erreger von Kleekrebs. — Arb. d. Biol. Reichsanst. 5.

Dangeard, P. A. 1907. L'origine du périthèce chez les Ascomycètes. — Le Botaniste 10.

» — 1919. Sur la distinction du chondriome des auteurs en vacuome, plastidome et sphérome. — C. R. Acad. Sciences 169.

De Lamater, E. S. 1937. Crozier formation in the Gymnoascaceæ. — Mycologia 29.

Dimock, A. W. 1937. Observations on sexual relations in *Hypomyces Ipomoeae*. — Mycologia 29.

Dodge, B. O. 1920. The life history of *Ascobolus magnificus*. — Mycologia 12.

» 1927. Nuclear phenomena associated with heterothallism and homothallism in the Ascomycete *Neurospora*. — Jour. Agric. Res. 35.

» — 1928. Production of fertile hybride in the Ascomycete *Neurospora*. — Jour. Agric. Res. 36.

» 1931. Heterothallism and hypothetical hormones in *Neurospora*. — Bull. Torrey Bot. Club 59.

» 1932. The non-sexual and the sexual functions of microconidia of *Neurospora*. — Bull. Torrey Bot. Club 59.

» — 1935. The mechanics of sexual reproduction in *Neurospora*. — Mycologia 27.

Dowding, E. S. 1931. The sexuality of the normal, giant and dwarf spores of *Pleurage anserina* (Ces.) Kunze. — Ann. Botany 45.

—»— 1933. *Gelasinospora*, a new genus of Pyrenomycetes with pitted spores. — Can. Jour. Res. 9.

Drayton, F. L. 1932. The sexual function of the microconidia in certain Discomycetes. — Mycologia 24.

» — 1934. The sexual mechanism of *Sclerotinia Gladioli*. — Mycologia 26.

»— 1937. The perfect stage of *Botrytis convoluta*. — Mycologia 29.

Duff, G. H. 1922. Development of the Geoglossaceae. — Botan. Gaz. 74.

Ekholm, N. 1914. Beräkning av luftens månadsmedeltemperatur vid de svenska meteorologiska stationerna. — Bihang. Meteor. Centr. Anst. Bd 42. Stockholm 1914.

Ekstrand, H. 1937. Sklerotiesjuka på fodergräs. — Växtskyddsnotiser. Stat. Växtsk. Anst. Skrifter. Bd 3.

»— 1939. Höstsädens och vallväxternas övervintring. — Växtskyddsnotiser. Stat. Växtsk. Anst. Skrifter. Bd 4.

Emmons, C. W. 1935. The ascocarps in species of *Penicillium*. — Mycologia 27.

Eriksson, J. 1880. Om klöverrötan, med särskilt avseende på dess uppträdande i vårt land under åren 1878—79. — Kungl. Lantbruks-Akad. Handl. och Tidskr. Stockholm 1880.

Fischer, E. und Gäumann, E. 1929. Biologie der pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze. — Jena.

Fitzpatrich, H. M. 1917. The development of the ascocarp of *Rhizina undulata*. — Botan. Gaz. 63.

—»— 1918. Sexuality in *Rhizina undulata*. — Botan. Gaz. 65.

FRASER, H. C. I. 1907. On the sexuality and development of the ascocarp in *Lachnea stercorea*. — Ann. Botany 21.

—»— H. C. I. 1913. The development of the ascocarp in *Lachnea cretea*. — Ann. Botany 27.

GÄUMANN, E. 1923. Beiträge zu einer Monographie der Gattung *Peronospora*. — Beitr. Krypt. fl. d. Schweiz 5.

GÄUMANN, E. and DODGE, C. W. 1928. Comparative morphology of fungi. — New York.

GÄUMANN, E. 1940. Neuere Erfahrungen über die Entwicklungsgeschichte der Ascomyceten. — Zeitschr. f. Botanik 35.

GELIN, O. och SCHWANBOM, N. 1941. Weibulls Resistenta Rödklöver. — W. Weibulls Årsbok 36. Landskrona 1941.

GILBERT, A. H. and BENNET, C. W. 1917. *Sclerotinia Trifoliorum*, the cause of the stem rot of clovers and alfalfa. — Phytopathology 7.

GJURAŠIN, S. 1925. Mycogalopsis retinospora nov. gen. et nov. spec. et son developement. — Acta Bot. Inst. Univ. Zagreb. 1.

GODFREY, G. H. 1923. Gray mould of càstor bean. — Jour. Agric. Res. 23.

GREGORY, P. H. 1938. *Sclerotinia polyblastis* n. sp. on *Narcissus*, the perfect stage of *Botrytis polyblastis* Dowson. — Trans. Brit. Myc. Soc. 22.

GREIS, H. 1938. Die Entstehung der Basidiomycetenschnallen aus den Ascomycetenhaken. — Jahrb. Wiss. Botanik 86.

» 1941. Mutations- und Isolationsversuche zur Beeinflussung des Geschlechts von *Sordaria fimicola* (Rob.). — Zeitschr. f. Botanik 37.

GROVES, J. W. and DRAYTON, F. L. 1939. The perfect stage of *Botrytis cinerea*. — Mycologia 31.

GUILLERMOND, A. 1903. Contribution à l'étude cytologique des Ascomycètes. — C. R. Acad. Sciences 137.

—»— 1904. Recherches sur la karyokinèse chez les Ascomycètes. — Rev. Gén. Botanique 16.

»— 1905. Remarques sur la karyokinèse des Ascomycètes. — Ann. Mycologici 3.

»— 1911. Aperçu sur l'evolution nucléaire des Ascomycètes. — Rev. Gén. Bot. nique 23.

»— 1913 a. Les progrès de la cytologie des Champignons. — Prog. Rei Botan. 4.

—»— 1913 b. Nouvelles observations sur le chondriome des Champignons. — C. R. Acad. Sciences 156.

GÜSSOW, H. T. 1903. Clover sickness and its cause. — Jour. Roy. Agric. Soc. Eng. 64.

GWYNNE-VAUGHAN, H. C. I. and BARNES, B. 1937. The structure and the development of the Fungi. 2nd ed. — Cambridge.

HAENICKE, A. 1916. Vererbungsphysiologische Versuche an Arten von *Penicillium* und *Aspergillus*. — Zeitschr. f. Botanik 8.

HAMMARLUND, C. 1925. Zur Genetik, Biologie und Physiologie einiger Erysiphaceen. — Hereditas 6.

HANSEN, H. N. and SMITH, R. E. 1932. The mechanism of variation in imperfect fungi. — Phytopathology 22.

HANSEN, H. N. 1938. The dual phenomenon in imperfect fungi. — Mycologia 30.

HARDER, R. 1911. Über das Verhalten von Basidiomyceten und Ascomyceten in Mischkulturen. — Diss. Kiel.

» 1927. Zur Frage nach der Rolle von Kern und Protoplasma im Zellgeschehen und bei der Übertragung von Eigenschaften. — Zeitschr. f. Botanik 19.

HARPER, R. A. 1900. Sexual reproduction in *Pyronema confluens* and the morphology of the ascocarp. — Ann. Botany 14.

» 1905. Sexual reproduction and the organisation of the nucleus in certain mildews. — Carnegie Inst. Washington, Publ. 14.

HENSON, L., VALLEAU, W. D. and FERGUS, E. N. 1933. Resistance of red clovers to *Sclerotinia Trifoliorum* and infection studies. — Kentucky Agric. Exp. Sta. Bull. 341.

HENSON, L. 1935. Apothecium production in *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. trifoliorum*. — Phytopathology 25.

HENSEN, L. and VALLEAU, W. D. 1940. The production of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. trifoliorum* in culture. — Phytopathology 30.

HEUBERGER, J. W. 1934. Fruit-rotting Sclerotinias IV. A cytological study of *S. fructicola* (Wint.) Rehm. — Maryland Agric. Exp. Sta. Bull. 371. —Ref. Biol. Abstr. 10. 1936.

JOHANNSEN, W. 1926. Elemente der exakten Erblichkeitslehre 3. Aufl. — Jena.

KEAY, M. A. 1939. A study of certain species of the genus *Sclerotinia*. — Ann. appl. Biol. 26.

KEITT, G. W. and LANGFORD, M. H. 1940. A preliminary report on variability and inheritance in *Venturia inaequalis*. — Phytopathology 30.

KERL, I. 1937. Über Regenerationsversuche an Fruchtkörpern und andere entwicklungsphysiologische Untersuchungen bei *Pyronema confluens*. — Zeitschr. f. Botanik 31.

KHARBUSH, S. 1927. Evolution nucleaire du *Sclerotinia Fuckeliana* de Bary. — Bull. Soc. Bot. France 74.

KLEMM, M. 1938. Schadgebiete des Kleekrebses (*Sclerotinia trifoliorum* Erikss.) in Deutschland, Kleesamenbau und Witterung. — Zeitschr. Pfl. Krankh. 48.

KNIEP, H. 1913. Beiträge zur Kenntnis der Hymenomyceten I, II. — Zeitschr. f. Botanik 5.

»— 1915. Beiträge zur Kenntnis der Hymenomyceten III. — Zeitschr. f. Botanik 7.

»— 1917. Beiträge zur Kenntnis der Hymenomyceten V. — Zeitschr. f. Botanik 9.

»— 1928. Die Sexualität der niederen Pflanzen. — Jena.

» 1929. Vererbungserscheinungen bei Pilzen. — Bibliographia Genetica 5.

KÜHN, J. 1870. Über die Sklerotinienkrankheit des Klees. — Hedwigia 9.

LA COUR, L. 1931. Improvements in everyday technique in plant cytology. Jour. Roy. Micr. Soc. 51.

LINDEGREN, C. 1932. The genetics of *Neurospora*. II Segregation of the sex factors in the asci of *N. crassa, N. sitophila* and *N. tetrasperma*. — Bull. Torrey Bot. Club 59.

» 1933. The genetics of *Neurospora*. III Pure bred stocks and crossing over in *N. crassa*. — Bull. Torry Bot. Club 60.

» 1934. The genetics of *Neurospora*. IV The inheritance of tan versus normal. — Amer. Jour. Bot. 21.

LINDFORS, TH. och HOLMBERG, CH. 1941. Växtsjukdomar i Sverige 1933—1937. Stat. Växtskyddsanst. Medd. 33. Bd 4.

LOHWAG, H. 1927. Das Oogon als Wesensbestandteil der Geschlechtsorgane. — Biologia Generalis 3.

Lundegårdh, H. 1910. Über Kernteilung im den Wurzelspitzen von *Allium cepa* und *Vicia faba*. — Svensk Bot. Tidskr. 4.

Maire, R. 1903. Recherches cytologiques sur le *Galactinia succosa*. — C. R. Acad. Sciences 137.

» 1905. Recherches cytologiques sur quelques Ascomycètes. — Ann. Mycologici 3.

Martens, P. 1932. L'origine du »crochet» et de »l'anse d'anastomose» chez les Champignons supérieurs. — Bull. Soc. Myc. France 48.

Mattirolo, O. 1882. Sullo sviluppo e sullo sclerozio della *Peziza Sclerotiorum* Lib. — Nuovo Giornale Botanico Italiano 14.

Moreau, Mme. F. 1914. Les phénomènes de la sexualité chez les urédinées. — Le Botaniste 13.

Moreau, F. et Mme. F. 1922. Le mycélium à boucle chez les Ascomycètes. — C. R. Acad. Sciences 174.

» 1925 a. Recherches sur quelques Lichens de genres *Parmelia*, *Physcia* et *Anaptychia*. — Rev. Gén. Bot. 37.

—»— 1925 b. Crochets et anses ascogènes. — Bull. Soc. Myc. France 41.

» 1928. Les phénomènes cytologiques de la reproduction chez les Champignons des Lichens. — Le Botaniste 20.

Moreau, F. et Moruzzi, C. 1931. Sur les différences entre les thalles de signes opposés chez les Ascomycètes hétérothalliques. — C. R. Séanc. Soc. Biol. Paris 108.

Mounce, I. 1921. Homothallism and the production of fruit-bodies by monosporous mycelia in the genus *Coprinus*. — Trans. Britt. Myc. Soc. 7.

» 1929. Studies in forest pathology II. The biology of *Fomes pinicola* (Sw.) Cooke. — Canadian Dept. Agr. Bull. 111.

Mrak, E. M. and Bonar, L. 1938. The effect of temperature on asci and ascospores in the genus *Debaryomyces*. — Mycologia 30.

Nardi, R. 1930. Observations sur la caryocinèse chez quelques Ascomycètes. — Bull. Soc. Myc. France 46.

Nicolaisen, W., Leitzke, B. und Witzig, I. 1940. Untersuchungen im Rahmen der Züchtung der Kleearten auf Widerstandsfähigkeit gegen Kleekrebs (*Sclerotinia trifoliorum* Erikss.). — Phytopath. Zeitschr. 12.

Nilsson-Ehle, H. 1935. Züchtungsforschung im Dienst der Landwirtschaft. — Die Naturwissenschaften 23.

Nilsson, F. och Andersson, E. 1939. Några växthormoners inflytande på utvecklingen av rödklöver- och blålucernsticklingar. — Nordisk Jordbruksforskning 6, 1939.

Nilsson-Leissner, G. och Sylvén, N. 1929. Studier över klöverrötan (*Sclerotinia Trifoliorum*). — Sveriges Utsädesf. Tidskr. 39.

Nilsson-Leissner, G. 1934. New host species of the clover stem rot (*Sclerotinia trifoliorum*). — Bot. Notiser 1934.

—»— 1935. More new host species of the clover stem rot (*Sclerotinia trifoliorum*). — Bot. Notiser 1935.

Nilsson-Leissner, G. and Nilsson, F. 1940. Herbage plant breeding in Sweden. — Imp. Bur. Aberystwyth, Great Brit. and Cambridge Engl. Joint Publ. 3.

Oehlkers, F. 1940. Über Chromosomenfärbungen mit Gentianaviolett. — Zeitschr. f. Botanik 36.

PAPE, H. 1937. Beiträge zur Biologie und Bekämpfung des Kleekrebses (*Sclerotinia trifoliorum* Erikss.). — Arb. d. Biol. Reichsanst. 22.

PEGLION, V. 1916. Sulla morfologia e sullo condizioni de sviluppo della *Sclerotinia trifoliorum*. — R. Accademia Dei Lincei Serie 5. 25

POHJAKALLIO, O. 1940. Untersuchungen über den Kleekrebs und seinen Anteil am Verschwinden des Klees in Kleegrasgemischen. — Pflanzenbau 16.

POIRAULT, G. et RACIBORSKI, M. 1895. Sur le noyaux des urédinées. — Jour. de Bot. 9.

PORTER, L. 1924. Concerning the characters of certain fungi as exhibited by their growth in the presence of other fungi. — Amer. Jour. Bot. 11.

RAYMOND, J. R. 1934. Contribution à la connaissance cytologique des Ascomycètes. — Le Botaniste 26.

REHM, E. 1872. Die Entwicklungsgeschichte von Peziza ciborioides Fries. — Diss. Göttingen.

REHM, H. 1896. Ascomyceten. Rabenhorst's Kryptogamenflora Bd. 1, Abt. 3. — Leipzig.

ROEHMER, TH., FUCHS, W. H. und ISENBECK, K. 1938. Die Züchtung resistenter Rassen der Kulturpflanzen. — Berlin.

ROSENBERG, O. 1933. Askokarputvecklingen hos *Humaria aggregata* (B. et Br.) Sacc. — K. Svenska Vetenskapsakademiens Årsbok 1933.

ROSTRUP, E. 1890. Kløverens Bægersvamp i Vinteren 1889—90. — Tidsskr. f. Landøkonomie 5.

RUDORF, W. 1937. Untersuchungen zur Züchtung Kleekrebsresistenten Kleearten und Luzerne. — Züchter 9.

SAPPIN-TROUFFY, P. 1896. Recherches histologique sur la famille des Urédinées. — Le Botaniste 5.

SCHREINER, E. J. 1931. Two species of *Valsa* causing disease in *Populus*. — Amer. Jour. Bot. 18

SCHÖNEFELDT, M. 1935. Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen bei *Neurospora tetrasperma* und *N. sitophila*. — Zeitschr. Ind. Abst. u. Vererb. lehre 69.

SHARP, L. W. 1934. Introduction to cytology. 3rd Ed. — New York.

SHEAR, C. L. and DODGE, B. O. 1927. Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group. — Jour. Agric. Res. 34.

Statens Meteorologisk-Hydrografiska Anstalts Årsbok. 1931—1941. — Stockholm.

SWINGLE, D. B. 1934. Fertilization in *Ascodesmis nigricans* Van Tiegh. — Amer. Jour. Bot. 21.

SYLVÉN, N. 1927. Klöverförökning medelst sticklingar. — Sveriges Utsädesf. Tidskr. 37.

—»— 1936. Die natürliche Auslese im Dienste der Rotkleezüchtung. — Züchter 8.

TROUSSOWA, N. P. 1927. Fungal diseases of red clover. — La défence des Plantes. — Ref.: Rev. Appl. Mycol. 6.

TULASNE, L. R. 1852. Des spermogonies. Memoire à l'histoire organographique et physiologique des lichens. — Ann. Sci. Nat. III. 17.

WADHAM, S. M. 1925. Observations on clover rot (*Sclerotinia trifoliorum* Eriks.). — The New Phytologist 24.

WHETZEL, H. H. 1937. *Septotinia*, a new genus of the Ciborioideae. — Mycologia 29.

WILCOX, M. S. 1928. The sexuality and arrangement of the spores in the ascus of *Neurospora sitophila*. — Mycologia 20.

WILSON, E. B. 1928. The cell in development and heredity. 3rd Ed. — New York.

WILSON, I. 1937. A contribution to the study of the nuclei of *Peziza rutilans* Fries. — Ann. Botany N. S. 1.

WINGE, Ø. 1937. Arvelighedslære. 2. Udg. København.

WINGE, Ø. and LAUSTSEN, O. 1940. On a cytoplasmatic effect of inbreeding in homozygous yeast. — C. R. Laboratoire Carlsberg. 23.

ZIMMERMAN, A. 1927. Sammelreferate über die Beziehungen zwischen Parasit und Wirtspflanze. *Sclerotinia, Monilia* und *Botrytis*. — Centralbl. f. Bakt. Abt. II, 69—70.